



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Prevalencia de enfermedades transmitidas por vectores
en perros domésticos de zonas rurales del
departamento de Tumbes**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Luis Alfredo JULCA SILVA

ASESOR

Luis Antonio GÓMEZ PUERTA

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Julca L. Prevalencia de enfermedades transmitidas por vectores en perros domésticos de zonas rurales del departamento de Tumbes [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2020.

Hoja de Metadatos complementarios

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0001-7492-8272
DNI o pasaporte del autor	72041130
Código ORCID del asesor	http://orcid.org/0000-0002-7909-979X
DNI o pasaporte del asesor	10810335
Grupo de investigación	ATENEO - Abocado a responder amenazas y oportunidades del sector pecuario.
Agencia financiadora	---
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Puerto el Cura, Av. Panamericana Norte, km1275, Tumbes - Perú (3.553813481800877, 80.42901007578286)
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019-2020
Disciplinas OCDE	4.03.01 -- Ciencia veterinaria http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 06/11/2020

HORA INICIO: 12:00 p.m.

HORA TÉRMINO: 13:00

2. MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: **MV. PhD. César Miguel Gavidia Chucán**

MIEMBRO: **MV. Mg. Miryam Jeanette Quevedo Urday**

MIEMBRO: **MV. Mg Luis Antonio Hoyos Sifuentes**

ASESOR: **MV. Mg. Luis Antonio Gómez Puerta**

3. DATOS DEL TESISISTA

APELLIDOS Y NOMBRES: **JULCA SILVA, LUIS ALFREDO**

CÓDIGO: 14080025

R.R. DE GRADO DE TESISISTA NÚMERO: **N° 013738-2020-R/UNMSM**

TÍTULO DE LA TESIS: **“PREVALENCIA DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES EN PERROS DOMÉSTICOS DE ZONAS RURALES DEL DEPARTAMENTO DE TUMBES”**

4. RECOMENDACIONES

Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:

<https://meet.google.com/mgq-ajff-vre>

ID: mgq-ajff-vre

Grabación archivada en:


https://drive.google.com/file/d/1mLZk_ehI9R9Nz1ENbpbyQ4hpgzU5dI14/view

5. NOTA OBTENIDA: ...17 (en números), ...DIECISIETE.....(en letras)

6. PÚBLICO ASISTENTE: (Nombre, apellido y DNI)

Apellidos y Nombres	DNI	Correo electrónico
Ana Miluska Vargas Calla	45705704	ana.vargas@unmsm.edu.pe
Armando Emiliano Gonzalez Zariquiey	07330504	agonzalezz@unmsm.edu.pe
Brenda Abigail Paz Almonte	74526138	brenda.paz@unmsm.edu.pe
Cesar Gavidia Chucán	09222190	cgavidiac@unmsm.edu.pe
Dennis Alexander Navarro Mamani	70444236	dnavarrom@unmsm.edu.pe
Elizabeth del Carmen Quispe garay	45009153	elizabeth.quispe11@unmsm.edu.pe
Emelin Cruz Calixto	76287759	emelinvet5@gmail.com
Faride Vanesa Altamirano Zevallos	43695598	faltamiranoz@unmsm.edu.pe
Gustavo Guerrero	71744530	gustavodgqdgq@gmail.com
Josselyn Escano	71251311	josselyn.escano@gmail.com
Liz Karen Pumacahua Bazán	72506021	liz.pomacarhua@unmsm.edu.pe
Luis Antonio Gómez Puerta	10810335	lgomezp@unmsm.edu.pe
Luis Cerro Temoche	41341572	lcerrot@unmsm.edu.pe
Luis Antonio Hoyos Sifuentes	41175479	luis.hoyos@unmsm.edu.pe
Madeline Victoria García Leandro	41552864	madeline.garcia@unmsm.edu.pe
María Cruz Saravia	76286996	maria.cruz@unmsm.edu.pe
María Fernanda Escano Lopez	71251310	maria.escano.lopez@gmail.com
Maria Teresa López Urbina	9145647	mlopezu@unmsm.edu.pe
Miryam Jeanette Quevedo Urday	040064320	mquevedou@unmsm.edu.pe
Noriko Oviedo Centeno	76970467	yahaira.oviedo@unmsm.edu.pe
Unidad de Estadística e Informática		informatica.fmv@unmsm.edu.pe

7. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO

 Firma
MV. PhD. Gavidia Chucán César Miguel Apellidos y Nombres
PRESIDENTE

 Firma	 Firma	 Firma
MV. Mg. Luis Antonio Gómez Puerta Apellidos y Nombres	MV. Mg. Quevedo Urdy Miryam Jeanette Apellidos y Nombres	MV. Mg Hoyos Sifuentes Luis Antonio Apellidos y Nombres
ASESOR DE LA TESIS	MIEMBRO JURADO	MIEMBRO JURADO

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi corazón a mis padres Alfredo y María, a quienes les debo todo lo que soy, no hubiera podido lograr nada sin su apoyo incondicional, dedicación y comprensión a lo largo de todos estos años de estudio, este logro también es de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Gómez por asesorarme de la mejor manera en la elaboración de esta tesis, desde el inicio de este trabajo su interés y preocupación es de admiración, por inculcar y motivar la investigación, su trayectoria profesional es un ejemplo para mí, además de un asesor lo considero un amigo.

Al Dr. Armando González y Dra. Teresa López, por su amabilidad y cariño, además de permitirme apoyar y aprender en el laboratorio.

A la Dra. Ana Vargas por las clases, consejos y apoyo que mejoraron en gran medida este trabajo.

A mis amigos del Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria, Valdivia, Martha, Soraya, Jacky por la ayuda que me brindaron para la realización de este trabajo.

Contenido

	pág.
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	10
I. INTRODUCCION	11
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	13
2.1 Enfermedades transmitidas por vectores	13
2.2 Clasificación de las enfermedades transmitidas por vectores.	14
2.2.1 Principales bacterias transmitidas por vectores	14
2.2.2 Principales parásitos transmitidos por vectores	16
2.3 Vectores	17
2.3.1 Garrapatas	17
2.3.1.1 Taxonomía	17
2.3.1.2 Ciclo biológico	18
2.3.1.3 Garrapatas como vector de enfermedades	19
2.3.2 Mosquitos	19
2.3.2.1 Taxonomía	19
2.3.2.2 Ciclo biológico	20
2.3.2.3 Mosquitos como vector de enfermedades	22
2.4 Enfermedades transmitidas por garrapatas	23
2.4.1 Ehrlichiosis canina	23
2.4.1.1 Taxonomía	23
2.4.1.2 Etiología y epidemiología	24
2.4.1.3 Patogenia	24
2.4.1.4 Signos clínicos	25
2.4.1.4.1 Fase aguda	26
2.4.1.4.2 Fase subclínica	26
2.4.1.4.3 Fase crónica	26
2.4.1.5 Diagnostico	27
2.4.1.6 Evaluación de hematología y frotis de sangre	27
2.4.1.7 Bioquímica sanguínea	28
2.4.1.8 Serología	28

2.4.1.9	Técnicas moleculares	29
2.4.1.10	Estudios de Ehrlichiosis Canina en el Perú	30
2.4.2	Anaplasmosis canina	32
2.4.2.1	Taxonomía	32
2.4.2.2	Etiología y epidemiología	32
2.4.2.3	Patogenia	33
2.4.2.4	Signos clínicos	34
2.4.2.5	Diagnostico	34
2.4.2.6	Evaluación hematológica y frotis sanguíneo	34
2.4.2.7	Bioquímica sanguínea	35
2.4.2.8	Serología	35
2.4.2.9	Técnicas moleculares	36
2.4.2.10	Estudios de Anaplasmosis canina en el Perú.	36
2.4.3	Borreliosis canina	38
2.4.3.1	Taxonomía	38
2.4.3.2	Etiología y epidemiología	38
2.4.3.3	Patogenia	39
2.4.3.4	Signos clínicos	41
2.4.3.5	Diagnostico	42
2.4.3.6	Evaluación hematológica	43
2.4.3.7	Serología	43
2.4.3.8	Técnicas moleculares	45
2.4.3.9	Estudios de Borreliosis canina en el Perú.	45
2.4.4	Dirofilariasis canina	46
2.4.4.1	Taxonomía	46
2.4.4.2	Etiología y epidemiología	46
2.4.4.3	Ciclo biológico	47
2.4.4.4	Patogenia	48
2.4.4.5	Signos clínicos	50
2.4.4.6	Diagnostico	51
2.4.4.7	Identificación de microfilarias	51
2.4.4.8	Serología	52
2.4.4.9	Técnicas moleculares	54
2.4.4.10	Estudios de la Dirofilariasis en el Perú.	54
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	56

3.1	Lugar de ejecución y periodo de duración	56
3.2	Tamaño de muestra	57
3.3	Descripción de material experimental	58
3.3.1	Material para toma de muestra	58
3.3.2	Material de oficina	58
3.3.3	Material de laboratorio	58
3.3.4	Material biológico	59
3.4	Metodología	59
3.5	Toma de muestra	59
3.6	Prueba Diagnostica	60
3.6.1	Tecnología de ensayo SNAP	60
3.6.2	Fundamento del ensayo SNAP	61
3.6.3	Procedimiento del ensayo SNAP 4Dx plus (IDEXX).	63
3.7	Diagnóstico de las muestras	63
3.8	Interpretación de resultados	64
3.9	Análisis de Datos	65
IV.	Resultados	67
V.	Discusión	76
VI.	Conclusiones	86
VII.	Bibliografía	87

RESUMEN

La ehrlichiosis, la anaplasmosis y la dirofilariasis canina son las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) más comunes de las Américas y pueden causar alta mortalidad en perros. En Perú, la mayoría de los estudios sobre ETV han sido realizados en Lima. Tumbes es un departamento ubicado en el norte de Perú y es un área endémica a ETV de humanos, como la malaria y el dengue. Su clima cálido y otros factores, como el cultivo de arroz y la presencia de bosques secos, generan un hábitat ideal para artrópodos vectores como garrapatas y mosquitos. El objetivo del presente estudio fue determinar las prevalencias de las enfermedades transmitidas por vectores en perros domésticos de zonas rurales del departamento de Tumbes. Se recolectaron muestras de sangre de perros (n=169) de tres distritos de la provincia de Tumbes Garbanzal (n=59), Puerto Pizarro (n=59) y Rica Playa (n=51). Las muestras fueron analizadas mediante una prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) comercial (SNAP-4Dx Plus, IDEXX) para detectar ETV (ehrlichiosis, anaplasmosis, borreliosis y dirofilariasis). El muestreo fue realizado en el mes de enero y las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Parasitología del Centro para la Salud Global - Tumbes (UPCH). Los resultados de la prueba serológica demostraron una prevalencia de 77.5% (131/169) con un IC 95% de 70.5 - 83.6 de anticuerpos para *E. canis*/*E. ewingii*, 37.9% (64/169) con un IC 95% de 30.5 - 45.6 de anticuerpos para *A. phagocytophilum*/*A. platys*, 26 % (44/169) con un IC 95% de 19.6 - 33.3 para antígeno de *Dirofilaria immitis*. No se halló perros positivos para anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* mediante la prueba SNAP 4Dx plus realizada en este estudio. Se encontró asociación estadísticamente significativa entre anticuerpos de *E. canis*/*E. ewingii* con las variables edad (p=0.002), lugar de crianza (p=0.003) y raza (p=0.032) y entre antígeno de *Dirofilaria immitis* con las variables edad (p=0.001), procedencia (p<0.001) y lugar de crianza (p=0.001). Estos hallazgos confirman una alta prevalencia de ETV que afectan a caninos en zonas rurales del departamento de Tumbes.

Palabras Clave: Enfermedades transmitidas por vectores, ehrlichiosis, anaplasmosis, dirofilariasis.

ABSTRACT

Ehrlichiosis, anaplasmosis, and canine heartworm are the most common vector-borne diseases (VBD) in the Americas and can cause high mortality in dogs. In Perú, most of the studies on VBD have been carried out in Lima. Tumbes is a department located in northern Perú and is an area endemic to human VBD, such as malaria and dengue. Its warm climate and other factors, such as rice cultivation and the presence of dry forests, generate an ideal habitat for arthropod vectors such as ticks and mosquitoes. The objective of this study was to determine the prevalences of vector-borne diseases in domestic dogs in rural areas of the department of Tumbes. Blood samples were collected from dogs (n = 169) from three districts of the province of Tumbes Garbanzal (n = 59), Puerto Pizarro (n = 59) and Rica Playa (n = 51). The samples were analyzed by a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (SNAP-4Dx Plus, IDEXX) for VTE (ehrlichiosis, anaplasmosis, borreliosis and heartworm). The sampling was carried out in January and the samples were processed in the Parasitology Laboratory of the Center for Global Health - Tumbes (UPCH). The results of the serological test showed a prevalence of 77.5% (131/169) with a 95% CI of 70.5 - 83.6 for antibodies to *E. canis* / *E. ewingii*, 37.9% (64/169) with a 95% CI of 30.5 - 45.6 for antibodies to *A. phagocytophilum* / *A. platys*, 26% (44/169) with a 95% CI of 19.6 - 33.3 for *Dirofilaria immitis* antigen. No positive dogs were found for antibodies to *Borrelia burgdorferi* by the SNAP 4Dx plus test performed in this study. A statistically significant association was found between antibodies to *E. canis* / *E. ewingii* with the variables age (p = 0.002), place of breeding (p = 0.003) and race (p = 0.032) and between *Dirofilaria immitis* antigen with the variables age (p = 0.001), origin (p <0.001) and place breeding (p = 0.001). These findings confirm a high prevalence of VBD affecting canines in rural areas of the department of Tumbes.

Keywords: Vector-borne diseases, ehrlichiosis, anaplasmosis, heartworm.

LISTA DE FIGURAS

	Descripción	Pág.
Figura 1.	Ciclo biológico de la garrapata <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	18
Figura 2.	La garrapata marrón del perro (<i>Rhipicephalus sanguineus</i>). (A) Hembra, vista dorsal. (B) Macho, vista dorsal.	19
Figura 3.	Mosquito adulto emergiendo de la etapa de pupa.	21
Figura 4.	Etapas del ciclo biológico de los principales mosquitos.	22
Figura 5.	Petequias en la piel abdominal debido a trombocitopenia en una perra infectada con <i>Ehrlichia canis</i> .	26
Figura 6.	Epistaxis unilateral en un perro debido a <i>Ehrlichia canis</i> .	27
Figura 7.	Garrapatas <i>Ixodes</i> importantes: (A) la garrapata de patas negras, <i>Ixodes scapularis</i> , hembra vista dorsal, (B) la garrapata de patas negras occidental, <i>Ixodes pacificus</i> , hembra vista dorsal.	33
Figura 8.	Ciclo biológico de <i>Ixodes escapularis</i> , vector de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto.	39
Figura 9.	Artritis causada por borreliosis inducida experimentalmente en perros.	42
Figura 10.	Ciclo biológico de <i>Dirofilaria immitis</i> en perros y gatos.	48
Figura 11.	Microfilarias: (A) <i>Acanthoceiloma reconditum</i> y (B) <i>Dirofilaria immitis</i> .	52
Figura 12.	Mapa de los distritos Garbanzal, Rica Playa y Puerto Pizarro de la provincia de Tumbes, departamento de Tumbes.	56
Figura 13.	Mecanismo detallado del dispositivo SNAP.	61
Figura 14.	Procedimiento de análisis de SNAP 4Dx plus.	64
Figura 15.	(A) Resultado positivo y (B) resultado negativo a la prueba SNAP 4Dx plus	65
Figura 16.	Resultados del SNAP 4Dx plus en muestras de perros provenientes de zonas rurales de Tumbes.	67

LISTA DE CUADROS

	Descripción	Pág.
Cuadro 1.	Principales enfermedades bacterianas transmitidas por artrópodos que afectan a perros y gatos.	14-15
Cuadro 2.	Principales enfermedades parasitarias transmitidas por artrópodos que afectan a perros y gatos.	16
Cuadro 3.	Resumen de signos clínicos de la enfermedad del gusano del corazón en perros.	51
Cuadro 4.	Sensibilidad y especificidad de cinco kits comerciales para la detección de anticuerpos para <i>Dirofilaria immitis</i> .	53
Cuadro 5.	Sensibilidad y especificidad de la prueba SNAP 4Dx Plus.	63
Cuadro 6.	Características de perros muestreados de zonas rurales de Tumbes (N=169).	68
Cuadro 7.	Prevalencia de enfermedades transmitidas por vectores en perros de zonas rurales de Tumbes (N=169).	69
Cuadro 8.	Seropositividad múltiple a la prueba Snap 4Dx en perros de zonas rurales de Tumbes (N=169).	69
Cuadro 9.	Factores asociados con la presencia de anticuerpos de <i>E. canis</i> / <i>E. ewingii</i> en análisis bivariado.	70
Cuadro 10.	Factores asociados con la presencia de anticuerpos de <i>A. phagocytophilum</i> / <i>A. platys</i> en análisis bivariado.	71
Cuadro 11	Factores asociados con la presencia de antígeno de <i>Dirofilaria immitis</i> en análisis bivariado.	72
Cuadro 12	Factores independientemente asociados a <i>E. canis</i> / <i>E. ewingii</i> , <i>A. phagocytophilum</i> / <i>A. platys</i> y <i>Dirofilaria immitis</i> en análisis de regresión bivariado.	74
Cuadro 13	Factores asociados a <i>E. canis</i> / <i>E. ewingii</i> y <i>Dirofilaria immitis</i> en análisis de regresión logística múltiple.	75

I. INTRODUCCION

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) en la medicina humana y veterinaria son de gran importancia debido a que existen una amplia gama de patógenos que interactúan con los mismos artrópodos vectores (Greene, 2012; Hoyos, 2013; Baldeviano *et al.*, 2015; Masgo, 2018). Algunas de las enfermedades infecciosas transmitidas por vectores son potencialmente mortales sus hospederos, incluyendo a los perros (Harrus *et al.*, 1999).

Las (ETV) son más importantes en las zonas de las regiones tropicales, ya que los climas de estas zonas son ideales para las garrapatas y los mosquitos (Otranto, 2018). La ehrlichiosis, anaplasmosis y dirofilariasis son las ETV más comunes en las Américas, pueden comprometer seriamente la salud canina, incluso causar la muerte en ellos. Varios factores hacen que estas enfermedades sean diagnosticadas tarde. Por ejemplo, tienen signos clínicos inespecíficos (anemia y trombocitopenia). Incluso puede haber coinfección de patógenos en los perros (Berrada y Telford, 2009; Dantas-Torres y Otranto, 2013; Alvarado-Rybak *et al.*, 2016).

La preocupación por estas enfermedades ha aumentado en los últimos años, debido al cambio climático o al calentamiento global, los vectores han aumentado en términos de población y se han expandido a nuevos territorios, expandiéndose de la misma manera los patógenos (Otranto y Wall, 2008; Bowman, 2014). En Perú, las ETV en perros han sido estudiadas y documentadas. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en Lima, la capital del Perú. Los estudios en Lima han demostrado una prevalencia de 16.5% para *Ehrlichia canis* (Adrianzén *et al.*, 2003), 3 a 5.5% para *Dirofilaria immitis* (Acuña y Chávez, 2002; Chipana *et al.*, 2002; Corimanya *et al.*, 2004), 1.4% para *Anaplasma platys* (Tateishi *et al.*, 2015), y solo dos casos de borreliosis por *Borrelia burgdorferi* (Rubio *et al.*, 2011).

Tumbes es un departamento del Perú ubicado en el norte, cerca del Ecuador. Debido a su ubicación geográfica tropical y su sabana tropical, tiene un clima cálido y semihúmedo durante todo el año, con una temperatura promedio anual de 30° C (SENAMHI, 2020). Del mismo modo, a las personas en Tumbes les gusta tener perros como mascotas, a pesar de que se crían fuera de las casas. En esta provincia los perros presentan comúnmente gran cantidad de ectoparásitos, principalmente garrapatas, las cuales, actúan como vectores de enfermedades importantes como la ehrlichiosis, anaplasmosis y borreliosis (Nuntón *et al.*, 2013).

Por otro lado, Tumbes es un área endémica de enfermedades transmitidas por vectores en humanos como la malaria y el dengue, esto debido a su clima que es propicio para la proliferación de mosquitos (Baldeviano *et al.*, 2015). Además, Tumbes es una región que está gravemente afectada por el Fenómeno del Niño (Bayer *et al.*, 2014). El clima cálido de Tumbes y otros factores, como el cultivo de arroz y la presencia de bosques secos, generan un hábitat ideal para artrópodos vectores como garrapatas y mosquitos; y, por lo tanto, las ETV podrían tener una alta prevalencia en perros de Tumbes.

Siendo Tumbes un departamento con características que potencian las ETV en perros, es importante conocer la situación epidemiológica de estas enfermedades. Así mismo los resultados de esta investigación servirán como base para futuros estudios.

El objetivo de esta investigación fue determinar las prevalencias de ETV en perros domésticos de zonas rurales de Tumbes planteando como hipótesis que, entre las enfermedades transmitidas por vectores en perros domésticos de zonas rurales del departamento de Tumbes, la ehrlichiosis presenta mayor prevalencia.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Enfermedades transmitidas por vectores

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) en caninos son causadas por una extensa lista de patógenos que incluyen virus, bacterias, protozoos y helmintos, que se transmiten por algunos tipos de artrópodos, como mosquitos, garrapatas y pulgas, principalmente. La principal vía de infección de los patógenos es durante la alimentación de los vectores, siendo la alimentación con sangre la forma más importante de transmitir los patógenos. Estos vectores no solo transmiten patógenos, también pueden generar otras patologías en el perro, principalmente reacciones alérgicas y lesiones cutáneas (Otranto, 2018).

Desde otro punto de vista, estos patógenos debido a su naturaleza zoonótica también pueden representar un riesgo constante para los humanos, lo que resalta la importancia de las mascotas como reservorios. Latinoamérica al ser una región con una de las biodiversidades más grandes del mundo, presenta una combinación de factores como la intensificación de las prácticas agrícolas, la modificación del paisaje en ciudades, la protección deficiente del ecosistema y una economía eventualmente inestable crea poblaciones vulnerables para el desempeño y persistencia de parásitos que actúan en su defecto como vectores (Maggi y Kramer, 2019).

Las principales ETV en caninos son la ehrlichiosis, anaplasmosis, dirofilariasis y la borreliosis canina. La ehrlichiosis y anaplasmosis se transmiten por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, la dirofilariasis es transmitida por mosquitos de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, la borreliosis canina es transmitida por las garrapatas *Ixodes pacificus*, *Ixodes escapularis* e *Ixodes ricinus* (Waner *et al.*, 2001; Kohn *et al.*, 2008; Stanek *et al.*, 2012; Dantas-Torres y Otranto, 2013).

2.2 Clasificación de las enfermedades transmitidas por vectores.

2.2.1 Principales bacterias transmitidas por vectores

Las principales enfermedades transmitidas por vectores que tienen por agentes a bacterias son: anaplasmosis, bartonelosis, borreliosis canina, ehrlichiosis y Rickettsiosis (Skotarczak, 2018) como se observa en el cuadro 1.

Cuadro 1. Principales enfermedades bacterianas transmitidas por artrópodos que afectan a perros y gatos (Love y Jones, 2012; Allison y Little, 2013; Little y Bowman, 2013).

Enfermedad (Agente)	Artrópodo vector	Distribución geográfica	Hospederos habituales (Reservorio)
Ehrlichiosis monocítica canina (<i>Ehrlichia canis</i>)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Dermacentor variabilis</i>	En todo el mundo, tropical y templado, excepto Australia	Perros (cánidos salvajes y domésticos)
Agente de ehrlichiosis venezolana (<i>E.canis</i>)	<i>R. sanguineus</i>	Venezuela	Humanos Perros (no documentado)
Ehrlichiosis monocítica humana (<i>Ehrlichia chaffeensis</i>)	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Amblyomma testudinarium</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>Ixodes ovatus</i> , <i>Haemaphysalis yeni</i> , <i>Haemaphysalis flava</i> , <i>Ixodes persulcatus</i>	Estados Unidos (principalmente sur), Missouri, Camerún.	Humanos Perros (venado de cola blanca, coyotes, zarigüeyas, mapaches y topillos)
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	<i>Amblyomma hebraeum</i>	África Subsahariana	Bovinos, ovinos, caprinos y perros

			(ungulados salvajes)
Ehrlichiosis granulocítica (<i>Ehrlichia ewingii</i>)	<i>Amblyomma americanum</i>	Medio oeste y sur de los Estados Unidos	Perros y humanos (venado de cola blanca)
Anaplasmosis trombocítica (<i>Anaplasma platys</i>)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	En todo el mundo	Perros
Anaplasmosis granulocítica (<i>Anaplasma phagocytophilum</i>)	<i>Ixodes</i> spp.	En todo el mundo, el hemisferio norte en zonas templadas	Perros, gatos, humanos, caballos, vacas, ovejas y cabras
Enfermedad de lyme (<i>Borrelia burgdorferi</i>)	<i>Ixodes pacificus</i> , <i>Ixodes escapularis</i> e <i>Ixodes ricinus</i>	Estados Unidos, Europa y Asia	Perros y humanos (roedores)
Bartonelosis (<i>Bartonella</i> spp.)	<i>R. sanguineus</i> , <i>Ixodes</i> spp., <i>Ctenocephalides felis</i>	En todo el mundo	Perros, gatos y humanos
Micoplasmosis (<i>Mycoplasma</i> spp.)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Estados Unidos, España y Australia	Perros y gatos
Rickettsiosis (<i>Rickettsia</i> spp.)	<i>D. variabilis</i> , <i>D. andersoni</i> , <i>Amblyomma cajennense</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Norte y Sur América	Perros y humanos

2.2.2 Principales parásitos transmitidos por vectores

Además de los patógenos virales y bacterianos, entre los parásitos encontramos helmintos y protozoarios como se observa en el Cuadro 2, de los cuales causan enfermedades graves y potencialmente fatales de animales domésticos y salvajes, que también se transmiten a través de artrópodos (Beugnet y Marie, 2009).

Cuadro 2. Principales enfermedades parasitarias transmitidas por artrópodos que afectan a perros y gatos (Greene, 2012; Bowman, 2014).

Enfermedad (Agente)	Artrópodo vector	Distribución geográfica	Hospederos habituales (Reservorio)
Babesiosis (<i>Babesia</i> spp.)	<i>Dermacentor reticulatus</i> , <i>Haemophysalis</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	En todo el mundo.	Perros
Hepatozoonosis (<i>Hepatozoon</i> spp.)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Europa del sur, Brasil, Argentina y América del Sur.	Perros
Leishmaniosis (<i>Leishmania</i> spp.)	<i>Lutzomyia</i> spp. <i>Phlebotomus</i> spp.	Cuenca del Mediterráneo, Medio Oriente y América del Sur.	Perros, gatos y humanos (Roedores).
Tripanosomiasis canina (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	<i>Triatoma</i> spp. <i>Rhodnius</i> spp.	Sur de Estados Unidos y América del Sur.	Perros y humanos (Roedores, mapaches, zarigüeyas, armadillos y zorrillos).
Dirofilariasis Gusano del Corazón (<i>Dirofilaria immitis</i>)	<i>Aedes</i> spp. <i>Culex</i> spp. <i>Anopheles</i> spp.	América del Norte, América Latina, Europa, Medio Oriente, Japón y Australia.	Perros y humanos (Canidos silvestres).

2.3 Vectores

2.3.1 Garrapatas

2.3.1.1 Taxonomía

Las garrapatas son parásitos externos de los vertebrados y se alimentan de sangre durante todos los estadios de su ciclo biológico, estos Arácnidos de la subclase Acarina pertenecen al superorden Parasitiformes. El superorden Parasitiformes engloba 3 ordenes: Ixodida, Mesostigmata y Holothyrida. El orden Ixodida presenta tres familias: Ixodidae (garrapatas duras), Argasidae (garrapatas blandas), y los Nuttalliellidae, que presentan una única especie (*Nuttalliella namaqua*) que se restringe su distribución a Sudáfrica (Márquez *et al.*, 2005).

La familia Ixodidae presenta seis subfamilias: Amblyomminae, Boyhriocrotoninae, Haemaphysalinae, Hyalomminae, Ixodinae y Rhipicephalinae, en estas subfamilias encontramos los géneros: *Amblyomma* con 130 especies, *Dermacentor* con 34 especies, *Haemaphysalis* con 166 especies, *Hyalomma* con 27 especies, *Ixodes* con más de 243 especies y *Rhipicephalus* con 87 especies (Horak *et al.*, 2002).

En el Perú diversos estudios dejan en evidencia la existencia de especies de garrapatas que son potenciales vectores de ehrlichiosis, anaplasmosis y borreliosis canina como: en Lima se encontró una prevalencia de 30% de garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* en 400 perros de cuatro distritos del norte de la capital (Estares, 1999), en Tumbes que se encontró una prevalencia del 92.5% para *Rhipicephalus sanguineus* en 40 perros vagabundos (Nuntón *et al.*, 2013), en Chiclayo, provincia de Lambayeque, 297 garrapatas de 74 perros con ehrlichiosis fueron de la especie *Rhipicephalus sanguineus* (Cervantes *et al.*, 2020), en Trujillo, tuvieron una prevalencia del 100% para *Rhipicephalus sanguineus* en un estudio donde se determinó especies de ectoparásitos de 111 perros (Huamán y Jara, 2017).

Por otro lado se encontró una prevalencia de 87.5% *Ixodes* sp. y de 66.6% con *A. maculatum* en animales domésticos provenientes de Piura y Amazonas, de los cuales el perro presento las dos especies de garrapatas (Glenny *et al.*, 2004), en otro estudio donde se colecto garrapatas de distintos departamentos, se observó espiroquetas semejantes a *B. burgdorferi* en el intestino de garrapatas de la especie *Haemaphysalis leporispalustris* (Macedo *et al.*, 1994) especie documentada como vector de *B. burgdorferi* en Estados Unidos (Lane, 1988), es importante

mencionar que estas especies de garrapatas han sido documentadas en distintas regiones del Perú (Need *et al.*, 1991).

2.3.1.2 Ciclo biológico

El ciclo de vida de todas las garrapatas duras (familia Ixodidae) consiste en el huevo y 3 etapas activas (larva, ninfa y adulto) (Figura 1). Cada etapa activa se alimenta solo una vez en su vida, aunque las hembras separadas por la fuerza de sus anfitriones pueden volver a unirse y continuar alimentándose (Sonenshine y Roe, 2014). En la garrapata del perro marrón, *Rhipicephalus sanguineus* (Figura 2), las larvas de seis patas se alimentan del perro durante unos días, se caen y mudan a la etapa de ninfa de ocho patas. Las ninfas se alimentan del perro durante aproximadamente una semana, se caen y se mudan a los adultos. Las hembras son fecundadas en el perro, se alimentan durante 1 a 3 semanas y se llenan de sangre antes de caer al suelo para poner de 2000 a 4000 huevos varias semanas después. Los huevos emergen de la abertura genital uno a la vez y se acumulan frente a la garrapata hembra durante un período de varias semanas más. El ciclo completo requiere de 2 a 3 meses, que es rápido en comparación con el de la mayoría de las especies de garrapatas (Bowman, 2014).

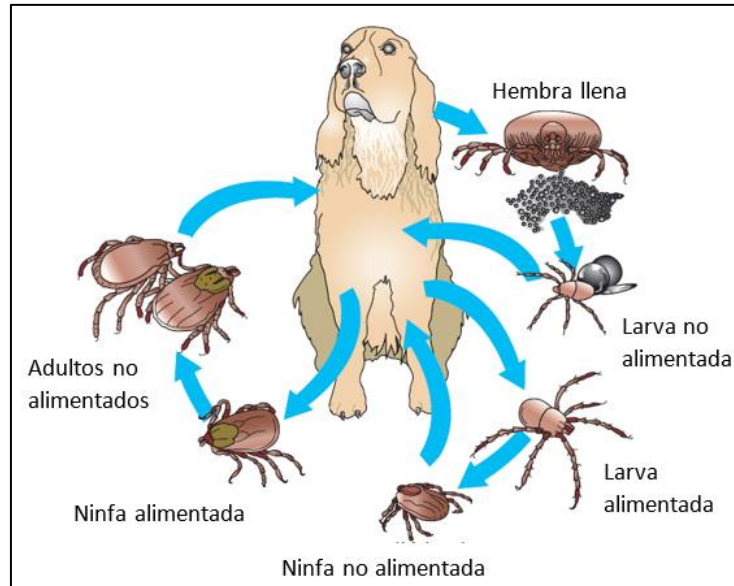


Figura 1. Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Bowman, 2014).

2.3.1.3 Garrapatas como vector de enfermedades

Debido a su naturaleza hematófaga, las garrapatas cumplen un papel importante en la transmisión de distintos microorganismos patógenos (virus, bacterias, parásitos), estos microorganismos, en su mayoría, son agentes responsables de enfermedades que afectan al hombre, animales domésticos y silvestres. La gran capacidad vectorial de la garrapata se debe a el prolongado período de alimentación, que permite la transmisión bidireccional de los agentes patógenos, la transmisión transestadial (larva → ninfa → adulto) de distintos agentes (p. ej., distintas *Rickettsia*), la alimentación de distintos estadios de una misma especie favorece en gran medida la transmisión horizontal de agentes patógenos, la alimentación que puede realizar sobre distintos hospederos conlleva a la transmisión de agentes patógenos entre individuos, la gran capacidad reproductiva de las hembras al depositar miles de huevos, resultando en un crecimiento exponencial de la población y la capacidad para mantenerse vivas tras largos períodos de inanición (Márquez *et al.*, 2005; Bowman y Patricia, 2008; Nava y Guglielmo, 2013).



Figura 2. La garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*). (A) Hembra, vista dorsal. (B) Macho, vista dorsal (Mullen y Durden, 2019).

2.3.2 Mosquitos

2.3.2.1 Taxonomía

La familia Culicidae, derivada del género *Culex*, nombre latino para "mosquito", forma parte de una de las principales poblaciones del suborden Nematocera, el infraorden

Culicomorpha, la cual engloba a dos superfamilias que incluyen a todos los nematóceras que se alimentan de sangre. La superfamilia Culicoidea comprende a las familias Dixidae, Chaoboridae, Corethrellidae y Culicidae, de los cuales los dos últimos mencionados se alimentan de sangre de vertebrados. Varias de estas familias son superficialmente similares. Sin embargo, entre todos los culicomorfos, la larga trompa de los mosquitos es distintiva, considerado el más especializado de las piezas bucales que pican entre Nematocera, e indica una asociación cercana de mosquitos con animales vertebrados (Beckerd *et al.*, 2010).

2.3.2.2 Ciclo biológico

El ciclo de vida holometabólico de los mosquitos se completa en dos ambientes diferentes, uno acuático y el otro terrestre (Figura 4), las larvas y pupas se desarrollan en una amplia gama de hábitats acuáticos, estos incluyen aguas superficiales temporales (Piscinas, pozas de lluvia y aguas de inundación, etc.), aguas superficiales permanentes (Piscinas, arroyos, pantanos y lagos), y diversos recipientes de retención de agua naturales y artificiales (Agujeros de árboles, conchas de moluscos, ollas de agua potable y neumáticos desechados, etc.). El requisito primordial que todos los sitios de desarrollo deben tener es que mantengan al menos una película de agua durante los períodos larvarios y pupales (Service, 1993).

Los huevos de mosquito se depositan sobre agua, las hembras de las subfamilias Anophelinae y la mayoría de las Culicinae de la tribu Sabethini esparcen sus huevos individualmente en la superficie del agua, mientras que los de la tribu Aedini (por ejemplo, *Aedes*, *Psorophora* y *Haemagogus*) colocan sus huevos individualmente en un sustrato que luego se inundara con agua, varios géneros de Culicinae ponen huevos aglomerados en balsas en forma de bote en la superficie del agua (por ejemplo, *Culex*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, *Uranotaenia*, *Armigeres* y *Trichoprosopon*), en zonas subtropicales, tropicales y veranos de algunas regiones con clima templado, los huevos naturalmente terminan el desarrollo embrionario de 2 a 3 días después de la puesta, pero podrían tardar una semana o más en zonas con climas fríos. La eclosión se produce a temperaturas cálidas después de que los huevos han estado previamente sumergidos, y la actividad microbiana ha generado que el nivel de oxígeno en el agua se reduzca (Mullen y Durden, 2019).

Las larvas dependiendo de la especie y las condiciones particulares del agua, la mayoría pasan la mayor parte de su tiempo en la superficie del agua o en la parte inferior de la columna de agua, llegando a la superficie en busca de aire solo ocasionalmente, en condiciones ideales de alimentación y temperatura (26 – 28° C), toda la fase larval de *Aedes aegypti*, un mosquito tropical

y subtropical, puede durar tan solo 5 - 6 días. Los primeros tres estadios se completan en aproximadamente 1 día cada uno y el cuarto dura generalmente 3 días. En muchas especies las larvas crecen aún más rápido cuando el agua se calienta por la luz solar directa, mientras que otras se desarrollan lentamente, el alimento en la etapa larvaria consiste en microorganismos como protozoos, algas, invertebrados y detritos. Cuando la temperatura es muy baja, o cuando la comida es escasa, el crecimiento se vuelve más lento y prácticamente puede cesar, sin embargo, las larvas permanecen vivas durante meses (Service, 1993; Beckerd *et al.*, 2010).

Las pupas también son acuáticas sin embargo pasa casi todo su tiempo en la superficie del agua, las etapas de la pupa generalmente duran aproximadamente 2 días, sin embargo, este período puede reducirse o extenderse, a temperaturas altas o bajas, respectivamente. A diferencia de las larvas, las pupas no se alimentan. Durante esta etapa pupal, tiene lugar el proceso de metamorfosis. Los machos adultos tienden a emerger de la etapa pupal antes que las hembras (Figura 3), debido a sus períodos de crecimiento larvario más cortos, la pupa permanece estacionaria en la superficie del agua y el abdomen se endereza gradualmente durante 10 a 15 min (Beckerd *et al.*, 2010; Service, 2012).



Figura 3. Mosquito adulto emergiendo de la etapa de pupa (Beckerd *et al.*, 2010).

En los adultos, las hembras de la mayoría de las especies de mosquitos requieren una ingesta de sangre antes de que los huevos puedan desarrollarse, por otro lado, las hembras son las únicas que succionan sangre y se sienten atraídas por los hospederos por diversos estímulos que emanan de su aliento o sudor, como el dióxido de carbono, el ácido láctico, el octenol, así como los olores y el calor del cuerpo. Los mosquitos hembra requieren al macho solo una vez para la

copula, ya que con esa inseminación se fertilizan todos los óvulos que producirá a lo largo de su vida. La cópula, usualmente, se lleva a cabo durante el vuelo. La alimentación de sangre ocurre en el día, en las primeras horas de la mañana o al anochecer, la hembra puede producir una camada de huevos cada vez que logre alimentarse (Service, 1993; Beckerd *et al.*, 2010; Mullen y Durden, 2019).

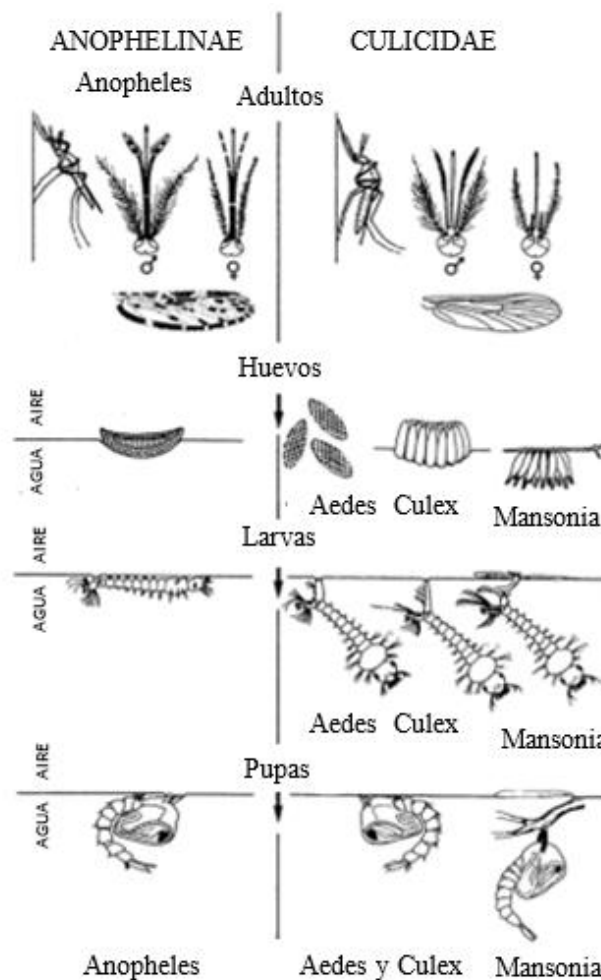


Figura 4. Etapas del ciclo biológico de los principales mosquitos (Service, 2012).

2.3.2.3 Mosquitos como vector de enfermedades

Los mosquitos son responsables de la transmisión de una gran variedad de patógenos y parásitos importantes para la salud de los seres vivos como virus, bacterias, protozoos y nematodos, que causan enfermedades graves como malaria, fiebre amarilla, dengue,

chikungunya, encefalitis y filariasis entre otras (Beaty y Marquardt, 1996; Eldridge y Edman, 2003).

La transmisión de estos patógenos se presenta de dos maneras: biológica o mecánica. La transmisión biológica es más complicada, ya que implica una etapa obligatoria de replicación y / o desarrollo del patógeno o parásito en el insecto vector, esto tiene sentido en parte a su alimentación de succión de sangre, los mosquitos pueden obtener los patógenos o parásitos de un hospedero vertebrado y trasladarlo a otro, teniendo en cuenta que la ecología y fisiología del mosquito sea idóneo para la transmisión. Los vectores que son en gran medida eficaces están asociados íntimamente con los hospederos, además su longevidad tiene que permitir que los patógenos lleguen a desarrollarse a sus etapas infecciosas en él. Para una transmisión exitosa, se necesitan múltiples ingestiones de sangre (Beckerd *et al.*, 2010).

Si hablamos de morbilidad y mortalidad ocasionadas por enfermedades transmitidas por vectores, los mosquitos son los vectores más eficientes que enfrentan la humanidad. Amenazan a más de tres mil millones de personas en las regiones tropicales y subtropicales, además también han influido notablemente en el desarrollo de la humanidad, no solo desde el punto de vista socioeconómico sino también político. Decididamente los patógenos transmitidos por vectores como los insectos que generan epidemias y pandemias han sido determinantes en el desarrollo, decadencia y caída de los imperios, como Roma y Grecia. La malaria que es transmitida por mosquitos fue el principal problema de salud en los últimos días del Imperio Romano (Bruce-Chwatt y Zulueta, 1980).

2.4 Enfermedades transmitidas por garrapatas

2.4.1 Ehrlichiosis canina

2.4.1.1 Taxonomía

La ehrlichiosis es producido por bacterias miembro de las α -prototeobacterias son organismos intracelulares obligados, cocoides, pleomórficos y Gram negativos de aproximadamente 0,5 μm de diámetro, cuando invade la célula del hospedero se replica en una vacuola intracitoplasmática de la membrana externa, donde forma estructuras de apariencia compacta llamadas mórulas (Rikihisa, 1991; Dumler *et al.*, 2001).

Los miembros de las α -prototeobacterias, dentro de las familias Rickettsiaceae y Anaplasmataceae del orden Rickettsiales, se sometieron a una reclasificación en el 2001, la reclasificación se indicó después de los análisis moleculares de las secuencias de genes de ARNr 16S bacteriano y groESL, en el cual se determinó que los géneros *Ehrlichia* y *Wolbachia* serían trasladados de la familia Rickettsiaceae a la familia Anaplasmataceae, así como también las especies que antes estaban incluidas en el género *Ehrlichia* (*Ehrlichia phagocytophilum*, y *Ehrlichia platys*) se han trasladado al género *Anaplasma*, de esta manera la familia Anaplasmataceae comprende los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* y *Wolbachia* (Dumler *et al.*, 2001).

El género *Ehrlichia* incluye las especies *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium* y *E. muris*, de las cuales se ha observado infección en perros de en todas estas especies, excepto *E. muris* (Breitschwerdt *et al.*, 1998; Allsopp y Allsopp, 2001).

2.4.1.2 Etiología y epidemiología

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es causada por la especie *Ehrlichia canis* que afecta a canidos e infecta células mononucleares y tiene como principal vector a la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus*, la ehrlichiosis granulocítica canina (EGC) es causada por *Ehrlichia ewingii* afecta a perros e infecta a granulocitos que tiene como principal vector a *Amblyomma americanum* (Anziani *et al.*, 1990; Skotarczak, 2003).

Estas enfermedades van de la mano con la presencia del artrópodo vector, como en el caso de *E. ewingii* que hay evidencia que ocurre con mayor frecuencia, particularmente en regiones del sur de los Estados Unidos donde hay grandes poblaciones de garrapatas *Amblyomma americanum* (Beall *et al.*, 2012). Por otro lado, *E. canis* tiene una distribución mundial siendo más frecuente en zonas tropicales y subtropicales, esto debido al ciclo biológico de su vector *R. sanguineus*, así como también la presencia cosmopolita de esta especie de garrapata (Day, 2016).

2.4.1.3 Patogenia

La infección en las garrapatas ocurre cuando se alimentan de un perro portador, dentro de sus cuerpos los microorganismos se multiplican dentro de las vacuolas de células epiteliales, así como dentro de las células de las glándulas salivales, la garrapata infectada se convierte en portadora de las rickettsias hasta 155 días, y dentro de la población de garrapatas a menudo se produce la transmisión transestadial del microorganismo (Mathew *et al.*, 1996).

La infección en el perro se produce después de una picadura de garrapata infectada. Los microorganismos en la saliva de los artrópodos ingresan al torrente sanguíneo del hospedero y se multiplican en las células sanguíneas infectadas creando mórulas (Rikihisa, 1991).

El período de incubación es de 8 a 20 días. Los organismos se multiplican en los macrófagos del sistema de fagocitos mononucleares por fisión binaria y se extienden por el cuerpo. Se cree que la infección se propaga entre las células a través del mecanismo de salida y absorción de sus proyecciones citoplasmáticas adyacentes. La replicación en el hospedero se realiza en vacuolas aisladas unidas a la membrana, protegidas del sistema de vigilancia inmune del hospedero, lisosomas e intermedios reactivos al oxígeno (Mathema *et al.*, 2013).

Se identificó un mecanismo de adaptación que permite que estas bacterias residan dentro de las vacuolas y se comuniquen con la célula hospedero a través del retículo endoplásmico en un grupo de genes de anquirina que codifican proteínas que se sugiere que median interacciones específicas de proteína-proteína. Las proteínas anquirina también afectan la expresión de citocinas proinflamatorias y la regulación negativa de los reguladores del ciclo celular. *Ehrlichia* puede liberarse para infectar nuevas células, por ruptura de la membrana de la célula hospedero después de la formación de mórulas (Nethery *et al.*, 2007).

Estas bacterias carecen de enzimas para la biosíntesis de peptidoglucanos y lipopolisacárido (LPS) que proporcionan resistencia a la membrana externa, en otras palabras, la ausencia de LPS y peptidoglucanos tiene implicaciones importantes para la infección y la supervivencia de los organismos en los hospederos de garrapatas y mamíferos. La carencia de LPS en estos organismos le proporciona que pueda sobrevivir, ya que el sistema inmune de la garrapata tiene capacidad de detectar LPS (Pereira *et al.*, 2001). En el hospedero mamífero, los macrófagos o neutrófilos pueden reconocer al patógeno mediante receptores a patógenos conservados mediante patrones moleculares como LPS o peptidoglucano. Cuando se reconoce un patógeno provoca una intensa respuesta inmune innata destinada a eliminar el patógeno; por lo tanto, la ausencia de LPS y peptidoglicano brinda a estos organismos rickettsiales, una ventaja adicional en la supervivencia intraleucocitaria (Rikihisa, 2006; McBride y Walker, 2011).

2.4.1.4 Signos clínicos

Luego del período de incubación es seguido por tres etapas consecutivas: aguda, subclínica y crónica.

2.4.1.4.1 Fase aguda

La fase aguda puede durar de 1 a 4 semanas con hallazgos clínicos de fiebre, anorexia, depresión, adenopatía linfática y esplenomegalia. De manera más variable, se observa secreción ocular, membranas mucosas pálidas, tendencias hemorrágicas como petequias dérmicas (Figura 5), equimosis, epistaxis unilateral o bilateral (Figura 6), aunque en muchos casos los signos son leves o no aparentes. Las anomalías hematológicas más comúnmente observadas son la trombocitopenia y la anemia. Los perros no tratados y aquellos tratados de manera inapropiada pueden recuperarse clínicamente pero luego ingresan a la fase subclínica (Harrus *et al.*, 1997b).

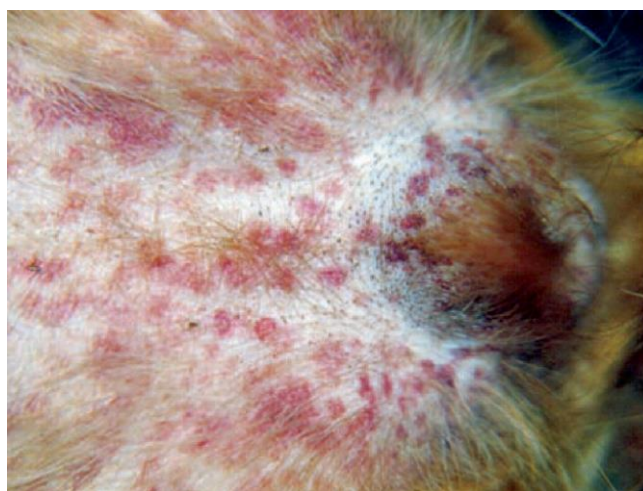


Figura 5. Petequias en la piel abdominal debido a trombocitopenia en una perra infectada con *Ehrlichia canis* (Greene, 2012).

2.4.1.4.2 Fase subclínica

La mayoría de los perros sobreviven a la fase aguda de la infección, se recuperan en 1 a 4 semanas para ingresar a la fase subclínica de la enfermedad, donde no muestran signos clínicos sin embargo se encontró trombocitopenia leve, y con un título de anticuerpos persistentemente alto (Waner *et al.*, 1997). Esta fase subclínica puede durar 4 meses en perros infectados experimentalmente, pero podría persistir hasta 10 años en perros infectados naturalmente (Bartsch y Greene, 1996).

2.4.1.4.3 Fase crónica

Por razones que aún no están claras, ciertos perros progresarán a la fase crónica. Durante la fase crónica, podrían observarse síntomas similares a los observados en la fase aguda, pero con mayor gravedad. Los hallazgos comunes en esta fase son mucosas pálidas, debilidad, sangrado y la pérdida de peso significativa (Harrus *et al.*, 1997b; Mylonakis *et al.*, 2004). En casos severos,

los perros en la fase crónica exhiben hipoplasia de médula ósea y pancitopenia severa, la respuesta a la terapia con antibióticos es pobre y los perros a menudo mueren de hemorragia masiva o infecciones secundarias (Harrus *et al.*, 1999).



Figura 6. Epistaxis unilateral en un perro debido a *Ehrlichia canis* (Greene, 2012).

En el caso de *Ehrlichia ewingii* la enfermedad suele ser leve o aguda que puede conducir a la poliartritis en perros con infección crónica. La cojera, la inflamación de las articulaciones, la marcha rígida y la pirexia son signos clínicos comunes sin embargo también se pueden observar que los perros muestran trombocitopenia leve a moderada, y pueden observarse tendencias hemorrágicas (Goldman *et al.*, 1998).

2.4.1.5 Diagnostico

El diagnóstico de ehrlichiosis generalmente se fundamenta en una combinación de anamnesis, signos clínicos y pruebas de laboratorio, es decir, vivir en un área endémica, infestación de garrapatas, signos clínicos, anomalías hematológicas y hallazgos serológicos.

2.4.1.6 Evaluación de hematología y frotis de sangre

Durante la etapa aguda de la infección, la trombocitopenia moderada a severa es un hallazgo hematológico distintivo. La evaluación del número de plaquetas en el frotis sanguíneo es obligatoria para confirmar la presencia de una trombocitopenia verdadera, la cual generalmente se acompaña de anemia leve y un recuento levemente reducido de glóbulos blancos en

comparación con los valores previos a la infección (Waner *et al.*, 1997). En la fase crónica, la trombocitopenia suele ser grave y se acompaña de anemia y leucopenia marcadas. La pancitopenia marcada debido a la hipoplasia de la médula ósea es un sello distintivo de la forma crónica severa (Harrus *et al.*, 1997b).

En algunos perros, las mórulas se observan dentro de los monocitos circulantes. En la evaluación citológica de frotis de sangre el hallazgo de mórulas dentro de los monocitos es insensible, especialmente en perros con infección crónica, y no se diferencia entre la infección por *E. canis* y *E. chaffeensis*. El uso de frotis de capa leucocitaria (buffy coat) o aspirados esplénicos aumenta la sensibilidad para la detección de mórulas. En un estudio, después de una búsqueda cuidadosa, se encontraron mórulas en solo 2 de 19 perros con (EMC) (Mylonakis *et al.*, 2004).

2.4.1.7 Bioquímica sanguínea

La hipoalbuminemia, la hipergammaglobulinemia y la hiperglobulinemia son alteraciones bioquímicas séricas que se presentan comúnmente en CME. La electroforesis de proteínas séricas puede revelar hipergammaglobulinemia policlonal en la mayoría de los casos, pero también pueden ocurrir gammapatías monoclonales. Los aumentos leves de alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP) son frecuentes en perros durante la fase aguda (Harrus *et al.*, 1996).

Las concentraciones de proteínas de fase aguda pueden aumentar durante la CME clínica. Se ha estudiado que las concentraciones de proteína C reactiva, proteína plasmática circulante que se incrementa en respuesta a la inflamación, aumenta entre 4 y 16 días, donde alcanza su punto máximo entre 15 y 42 días después de la inoculación con *E. canis* en cinco perros (Shimada *et al.*, 2002).

2.4.1.8 Serología

Existen diferentes métodos serológicos para el diagnóstico de CME y son consideradas técnicas importantes de detección y/o diagnóstico. La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) para anticuerpos IgG anti-*E. canis* se considera la 'Prueba de oro', un resultado positivo indicaría exposición a *E. canis*. Sin embargo, los anticuerpos solo se pueden detectar entre 7 y 28 días después de la infección. Los perros con ehrlichiosis aguda pueden tener resultados falsos negativos si no ha transcurrido el tiempo suficiente para que se produzca el anticuerpo, un título

inicial positivo de anticuerpos en suero puede reflejar la exposición previa, y no necesariamente la enfermedad. La nueva prueba debe realizarse de 2 a 3 semanas después para demostrar la seroconversión, los resultados de la serología deben interpretarse en conjunto con los signos clínicos del perro y los resultados de pruebas de otras posibles causas de enfermedad en el perro (Bartsch y Greene, 1996; McBride *et al.*, 2003).

Los perros que presentan una infección crónica por *E. canis* comúnmente tienen títulos demasiado altos en IFA, a veces superiores a 1: 600 000, y estos anticuerpos pueden permanecer constantes frente al tratamiento, lo que indicaría la permanencia continua del organismo. Los títulos altos no se asocian con la gravedad de la enfermedad en general o la duración de la enfermedad. Debido a la variabilidad de los informes entre laboratorios, no existe un título “promedio” que se utilice para separar los resultados positivos y negativos. Por otro lado, el diagnóstico mediante western blot es laborioso de realizar e interpretar y no está disponible de manera rutinaria, por lo que su empleo se restringe más a investigación (Rikihisa *et al.*, 1994; Mylonakis *et al.*, 2004).

Se han desarrollado ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) convencionales para anticuerpos IgG contra *E. canis* y son útiles para detectar anticuerpos contra *E. canis*. Se han desarrollado varias pruebas de estas “pruebas comerciales rápidas” midiendo la sensibilidad y especificidad para anticuerpos contra *E. canis*, diseñadas para un uso rápido en la clínica. Estos incluyen ensayos que utilizan todo el organismo cultivado o proteínas recombinantes específicas de *E. canis* (p30 y p30/31) como fuente de antígeno. Se debe tomar en cuenta estas pruebas como una innovación importante para la tecnología veterinaria en el diagnóstico de infección aguda por *E. canis* natural (Waner *et al.*, 2014).

2.4.1.9 Técnicas moleculares

Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ahora se consideran el método más confiable para diagnosticar la infección en perros con enfermedad aguda. Los métodos de PCR son altamente sensibles y permiten la detección del ADN de *Ehrlichia* spp. tan pronto como 4 a 10 días después de la infección, antes de la seroconversión. Numerosas PCR convencionales y en tiempo real están disponibles en base a diferentes secuencias de genes (Iqbal *et al.*, 1994; Harrus y Waner, 2011).

La técnica PCR se puede realizar en suero, sangre entera, aspirados esplénicos, ganglios linfáticos o médula ósea. Sin embargo, el bazo es el órgano con mayor probabilidad de albergar

a *E. canis* durante la fase subclínica, además de presentar una mayor sensibilidad en comparación a las pruebas de médula ósea o muestras de sangre. Para evaluar la eliminación de la infección después del tratamiento, la prueba de las muestras de bazo es recomendado (Harrus *et al.*, 1997a; Harrus *et al.*, 1998; Harrus *et al.*, 2004).

2.4.1.10 Estudios de Ehrlichiosis Canina en el Perú

En el Perú la mayoría de los trabajos sobre prevalencia de ehrlichiosis emplean pruebas de inmunoensayo, en la zona norte del país, específicamente en Tumbes donde se evaluó 52 perros pertenecientes al caserío “pechichal” se determinó una prevalencia de 67.3% de anticuerpos contra *E. canis* mediante ensayo inmunocromatográfico (Pinedo, 2018).

También en el norte, distrito de Castilla en Piura se determinó una prevalencia de 40.7% en 81 perros para el diagnóstico se detectó anticuerpos contra *E. canis* utilizando *Ehrlichia canis* test kit para la detección de IgG (Zapata, 2014), otro trabajo en Piura, se seleccionó 71 perros con garrapatas y con signos compatibles con ehrlichiosis y/o anaplasmosis que llegaban a consulta en una clínica veterinaria, determinó la frecuencia de la enfermedad mediante una prueba comercial ELISA SNAP 4Dx y se encontró que el 55 % presentaba anticuerpos para *Ehrlichia* spp. (Naranjo, 2018).

En la ciudad de Huánuco se determinaron factores asociados a la infección de *E. canis* determinando una prevalencia de 51.3% mediante inmunoensayo cromatográfico, además se determinó que el mal estado de salud del perro, el grado de infestación por garrapatas y los perros de edad adulta están asociados con la presencia de anticuerpos *E. canis* (Huerto-Medina y Damaso-Mata, 2015).

En Chimbote se determinó una prevalencia de 23.3% en 30 perros de clínicas veterinarias utilizando prueba comercial inmunocromatográfica (Jara, 2014). En Iquitos se determinó serológicamente mediante el kit de diagnóstico SNAP 4Dx a 30 perros con trombocitopenia y sospecha de ehrlichiosis encontrándose una prevalencia de 60% en estos canes (Villaverde, 2017).

En Tacna se realizó un estudio con 180 muestras y fueron analizadas mediante Kit de la prueba Rápida Anígen determinando una prevalencia de 37.78%, siendo una de las prevalencias más altas encontradas en ese departamento (Quenta, 2013). En la ciudad de Lima, en tres distritos de lima: Chorrillos, la Molina y San Juan de Miraflores, se evaluó 140 perros mediante la prueba

comercial SNAP combo canino (IDEXX) se obtuvo una prevalencia de 16.5% para anticuerpos contra *E. canis*. (Adrianzén *et al.*, 2003).

Otro estudio realizado en Lima, se evaluó a 77 perros de una clínica veterinaria, que presentaban signos clínicos de ehrlichiosis, se les evaluó mediante la prueba SNAP 3Dx (IDEXX) y hematológicamente encontrando una prevalencia de 75.3%, además de demostrar que el examen hematológico es de gran utilidad en el diagnóstico de la ehrlichiosis canina en el país, teniendo a la técnica directa de ELISA como una prueba confirmatoria. (Hoyos *et al.*, 2007).

En la región del norte de Lima se determinó una prevalencia de 59.4% para *E. canis* mediante la prueba comercial Anigen Rapid *E. canis* además se encontró asociación significativa de ehrlichiosis para los pacientes de raza mestiza y de edad mayor a 2 años (Zúñiga, 2018).

En el Perú los trabajos que identifican mediante técnicas moleculares a especies de ehrlichia son reducidos, uno de los primeros trabajos que describió la identificación molecular de la infección por *E. canis* en perros de Perú se realizó mediante la evaluación de muestras de sangre de perros con signos clínicos compatibles con ehrlichiosis en busca de infección por Ehrlichia canis mediante PCR, lo cual dio como resultado que 11 de 25 muestras dieran positivo para una nueva cepa de *E. canis* (Vinasco *et al.*, 2007).

Un estudio realizado en lima norte analizo 30 muestras de perros con hemograma compatible con ehrlichiosis canina mediante PCR obteniendo 43,3% muestras positivas a *Ehrlichia* spp., y el 36.7 % muestras positivas a *E. canis*, sin embargo, un 6.6 % de muestras negativas a *E. canis* fueron positivas a *Ehrlichia* spp., lo que indicaría que existe una posible infección de perros con otra especie distinta a *E. canis* que no fue detectada (Vicente, 2017).

Un estudio realizado en Lima, evaluó 200 muestras divididas en 2 grupos provenientes de personas relacionadas con la medicina veterinaria y dueños de caninos domésticos se sometieron a pruebas hematológicas, inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos (IFI) y Nested PCR para determinar alteraciones citopénicas compatibles con Ehrlichiosis, anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis* , y ADN de ambas bacterias, encontró la presencia de estas especies a nivel hematológico, serológico y molecular en muestras de sangre periférica de humanos en Lima Metropolitana (Hoyos, 2013).

Por otro lado, se reportó la presencia de ADN de *E. canis* en 13.7% de 205 perros de áreas urbanas en Perú, detectándose tres cepas únicas y nuevas de *E. canis*, las cepas halladas

fueron analizadas mediante variación filogenética usando el gen Tandem Repeat Protein 36 (TRP36) resultando que comparten una gran similitud con una cepa de *E. canis* detectada en cuatro muestras de bancos de sangre humanos en Costa Rica, informando por primera vez la existencia de perros domésticos infectados con cepas de *E. canis* estrechamente relacionadas con una cepa zoonótica (Geiger *et al.*, 2018).

2.4.2 Anaplasmosis canina

2.4.2.1 Taxonomía

La anaplasmosis canina es causada por *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys*, ambas pertenecientes a la orden Rickettsiales, estas son bacterias Gram negativas, obligatoriamente intracelulares, transmitidas por garrapatas, y que pertenecen a la familia Anaplasmataceae. *Ehrlichia phagocytophila* estaba filogenéticamente relacionada con las especies del género *Anaplasma*, por lo que se reclasificó como *A. phagocytophilum*. Además, se concluyó que *Ehrlichia platys* estaba más íntimamente relacionado con el género *Anaplasma* y posteriormente se le cambió el nombre a *Anaplasma platys*. (Dumler *et al.*, 2001).

2.4.2.2 Etiología y epidemiología

Anaplasma platys infecta específicamente a plaquetas, es el agente causante de Anaplasmosis trombocítica o trombocitopenia cíclica infecciosa en perros. Se transmite por la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Inokuma *et al.*, 2000; Sanogo *et al.*, 2003). Por otro lado, este organismo está muy extendido y ha sido reportado en diferentes localidades en las Américas, Europa, Asia, Australia, Medio Oriente y África (Sykes, 2014).

Anaplasma phagocytophilum infecta predominantemente a los neutrófilos, pero también a los eosinófilos, formando mórulas en la membrana de la célula hospedero. *A. phagocytophilum* es el agente causante de anaplasmosis granulocítica en perros y humanos, es transmitida por garrapatas del género *Ixodes*: *Ixodes ricinus* en Europa, e *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* (Figura 7) en los Estados Unidos (Bakken y Dumler, 2000; Blanco y Oteo, 2002).

Teniendo en cuenta la ubicación geográfica, existe una variedad de pequeños mamíferos de vida libre, incluidos ratones, ratones de campo y musaraña, así como ciervos y posiblemente aves actúan como reservorios de *A. phagocytophilum*. Para el Medio Oeste y el Este de los Estados Unidos, los ratones de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) y las ardillas del Este probablemente

actúen como reservorios, mientras que, en los estados del Oeste, se han implicado ratas de patas oscuras (*Neotoma fuscipes*) y ardillas (Telford *et al.*, 1996; Walls *et al.*, 1997).



Figura 7. Garrapatas *Ixodes* importantes: (A) la garrapata de patas negras, *Ixodes scapularis*, hembra vista dorsal, (B) la garrapata de patas negras occidental, *Ixodes pacificus*, hembra vista dorsal (Mullen y Durden, 2019).

2.4.2.3 Patogenia

Las garrapatas deben adherirse durante 36 a 48 horas en el hospedero para que ocurra la transmisión. Una vez que *A. phagocytophilum* ingresa al torrente sanguíneo, se adhiere a los ligandos sialilados en la superficie de los neutrófilos, como la glicoproteína P-selectina ligando-1, luego ingresa al neutrófilo a través de la endocitosis mediada por caveolas, que son invaginaciones de la membrana (Carrade *et al.*, 2009).

Después de la endocitosis, las bacterias se multiplican dentro de las vacuolas citoplasmáticas. Un factor de patogenicidad de *A. phagocytophilum* es su facultad para evitar la fusión de lisosomas con vacuolas que contienen *Anaplasma* dentro de la célula, previniendo así la degradación de la vacuola. Normalmente, los neutrófilos circulan de 10 a 12 horas antes de ingresar a los tejidos y sufrir la muerte por apoptosis. *A. phagocytophilum* retrasa la apoptosis de neutrófilos, lo que le permite sobrevivir períodos más largos de tiempo dentro del neutrófilo, además tiene la capacidad para disminuir la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales (Carrade *et al.*, 2009; Day, 2016).

Anaplasma platys causa trombocitopenia en perros, la trombocitopenia ocurre de 1 a 2 semanas después de la inoculación experimental. Este episodio inicial está asociado con el mayor número de organismos en las plaquetas, según se detectó mediante un examen microscópico de frotis sanguíneo (Harvey, 2012).

El punto más bajo del recuento de plaquetas ocurre de 2 a 3 semanas después de la infección y en algunos perros puede ser inferior a 20,000 plaquetas/ μ L. Los organismos visibles luego desaparecen de las plaquetas, y el recuento de plaquetas vuelve a los límites normales o casi normales en 3 a 4 días. Los ciclos de trombocitopenia y bacteriemia ocurren a intervalos de 7 a 14 días, de ahí se deriva el nombre trombocitopenia cíclica. Los títulos de anticuerpos pueden persistir durante 4 meses hasta varios años (Harvey, 2012; Sykes, 2014; Day, 2016).

2.4.2.4 Signos clínicos

La mayoría de los perros infectados naturalmente con *A. phagocytophilum* probablemente permanecen sanos, como lo indica la evidencia serológica generalizada de exposición en áreas endémicas en ausencia de antecedentes de enfermedad clínica (Foley *et al.*, 2001; Beall *et al.*, 2008).

Los signos clínicos más comunes en perros infectados con *A. phagocytophilum* que desarrollan la enfermedad aguda son letargo y fiebre, que ocurren después de un período de incubación de 1 a 2 semanas. Se ha informado letargo, articulaciones inflamadas y dolor a la manipulación articular se pueden detectar en algunos perros. La esplenomegalia y la linfadenopatía leve, detectadas durante el examen físico o después de imágenes radiográficas o ecográficas, también pueden estar presentes (Poitout *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008).

La mayoría de los perros con infección por *A. platys* no muestran signos clínicos. Se han reportado fiebre, hemorragias petequiales y uveítis, pero las coinfecciones con otros patógenos transmitidos por vectores pueden haber contribuido a estos signos (Gaunt *et al.*, 2010).

2.4.2.5 Diagnostico

La anaplasmosis granulocítica se debe considerar cuando un paciente presenta una enfermedad febril aguda en un área geográfica endémica para esta enfermedad y durante una temporada en la que su principal vector presenta un aumento de su población.

2.4.2.6 Evaluación hematológica y frotis sanguíneo

La identificación de mórulas en neutrófilos circulantes es el método de diagnóstico más rápido y barato que se aprecian en un frotis sanguíneo, sin embargo, no todos los casos naturales

reportados de infección canina por *A. phagocytophilum* se identificaron encontrando mórulas en neutrófilos circulantes. Morfológicamente, las inclusiones de *A. phagocytophilum* son indistinguibles de las inclusiones de *E. ewingii*, por lo tanto, se necesitarán otras técnicas de diagnóstico si el paciente no tiene manifestaciones clínicas típicas y anormalidades de laboratorio (Bakken y Dumler, 2008).

En el 90% de los perros con anaplasmosis granulocítica se observa trombocitopenia. El recuento de plaquetas en perros trombocitopénicos puede ser tan bajo como 5000 plaquetas/ μ L, aunque con mayor frecuencia es leve. La mayoría de los perros afectados presentan linfopenia, pero también se ha observado linfocitosis (Greig *et al.*, 1996; Kohn *et al.*, 2008; Granick *et al.*, 2009).

En la infección por *A. platys* la trombocitopenia es el principal hallazgo hematológico, aunque se ha informado de leucopenia en casos raros. La trombocitopenia es de presentación cíclica de 3 a 4 días de duración, seguida de períodos asintomáticos de 7 a 21 días. La anemia moderada no regenerativa puede ocurrir y es probablemente el resultado de la inflamación. Sin embargo, se puede esperar una anemia regenerativa en casos que experimentan sangrado severo (Day, 2016).

2.4.2.7 Bioquímica sanguínea

El hallazgo bioquímico más frecuente en perros con anaplasmosis granulocítica es la hipoalbuminemia leve a moderada, hiperglobulinemia leve, anormalidades electrolíticas leves como hipocalcemia, hiponatremia y acidosis metabólica, así como también un aumento leve en las actividades de fosfatasa alcalina y de alanina aminotransferasa (Kohn *et al.*, 2008; Granick *et al.*, 2009).

2.4.2.8 Serología

Se realizan pruebas serológicas para la detección de anticuerpos, entre los más empleados se encuentra la inmunofluorescencia (IFA). Los anticuerpos IgG son detectados aproximadamente desde los 8 días después de la exposición, 2 a 5 días después de que aparecen las mórulas. En otras palabras, los anticuerpos pueden ser indetectables al comienzo de la enfermedad, por lo que los ensayos de PCR pueden ser más útiles para el diagnóstico de infección aguda en ausencia de mórulas detectables (Egenvall *et al.*, 1997; Egenvall *et al.*, 2000).

Las pruebas de ELISA utilizan como antígeno una proteína Msp2/p44 recombinante, para la detección de anticuerpos contra especies de *Anaplasma* en suero de perro. Los resultados positivos obtenidos con estos ensayos (ELISA) no implican que *A. phagocytophilum* sea la causa de la enfermedad, y al igual que con las pruebas de IFA, pueden producirse resultados negativos en perros con enfermedad aguda debido al retraso en la producción de anticuerpos en relación con el inicio de los signos clínicos. Una desventaja de las técnicas serológicas es la reacción cruzada entre especies de *Anaplasma*, es decir los perros infectados con *A. platys* también seroreaccionan con el antígeno de *A. phagocytophilum* (Poitout *et al.*, 2005; Plier *et al.*, 2009).

2.4.2.9 Técnicas moleculares

Existen varios ensayos de PCR convencionales y en tiempo real para la detección de ADN de *A. phagocytophilum* en sangre periférica, capa leucocitaria, médula ósea o tejido esplénico. La mayoría de los ensayos, pero no todos, detectan el gen ARN ribosomal 16S o el gen de proteína de superficie externa msp2/p44. Las pruebas que detectan el gen ARN ribosomal 16S pueden detectar otras especies de *Anaplasma* e incluso otras bacterias, mientras que otras pruebas que detectan el gen msp2 suelen ser específicos para *A. phagocytophilum*. El ADN de *A. phagocytophilum* se ha amplificado ocasionalmente de perros sanos, por lo que los resultados deben interpretarse a la luz de los signos clínicos (Egenvall *et al.*, 1998; Egenvall *et al.*, 2000; Beall *et al.*, 2008).

En ausencia de mórulas claramente identificables dentro de las plaquetas, las pruebas de diagnóstico molecular con ensayos de PCR confiables que detectan específicamente el ADN de *A. platys* es la única forma de confirmar la infección activa. Los ensayos de PCR en tiempo real que detectan ADN de *A. platys* están disponibles comercialmente y en combinación con ensayos para otros patógenos transmitidos por vectores. Las muestras adecuadas incluyen sangre completa, capas leucocitarias o médula ósea y aspirados esplénicos. Cuando se usaron capas leucocíticas, los análisis de PCR para *A. platys* se obtuvieron positivos tan pronto como 3 a 5 días después de la infección experimental, pero para el día 21, se produjeron resultados negativos en algunos perros (Eddlestone *et al.*, 2007; Gaunt *et al.*, 2010).

2.4.2.10 Estudios de Anaplasmosis canina en el Perú.

En el Perú, existen estudios serológicos sobre anaplasmosis canina en la zona norte del Perú, en Lambayeque, específicamente los distritos de José Leonardo Ortiz, La Victoria y

Chiclayo, se determinó una seroprevalencia de 55.1% para *Anaplasma* spp. mediante el kit Vet Scan Anaplasma Rapid Test en 78 caninos procedentes de clínicas veterinarias (Delgado y Montoya, 2018).

Recientemente en el distrito de Chiclayo (Lambayeque) un estudio determinó anaplasmosis canina mediante el hallazgo hematológico y presencia de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. en perros con antecedentes de garrapatas en 88 muestras evidenciando que el 2.27% de perros fueron positivos (presentaron corpúsculos de inclusión o mórulas más trombocitopenia) y una prevalencia de 22.73% perros seropositivos a *Anaplasma* spp. mediante la prueba SNAP 4Dx Plus (Álvarez, 2019).

Otro estudio realizado en el distrito de La Victoria (Lambayeque) que estudio a 98 caninos sospechosos para anaplasmosis canina, para lo cual se utilizó examen hematológico y la prueba SNAP 4Dx Plus, determinandose una prevalencia 33.67 %, además de comprobar que el examen hematológico no es concluyente para la determinación de un animal sea libre a anaplasmosis (Paico, 2018).

En Piura, se determinó mediante el SNAP 4Dx y hemograma, una seroprevalencia de 4.2% para *Anaplasma* spp. en 71 perros con antecedentes de enfermedad e historial de garrapatas, además se determinó que los perros con serología positiva tenían signos clínicos característicos como anemia en un 51%, leucocitosis 51% y trombocitopenia 54% (Naranjo, 2018).

Por otro lado, en Lima se reportó una seropositividad para *A. phagocytophilum* mediante la prueba SNAP 4Dx en un perro con antecedentes de garrapatas que presentaba signos inespecíficos como decaimiento, palidez de mucosas con petequias y equimosis, este estudio fue el primero reportar anticuerpos contra anaplasma en el Perú (Rubio *et al.*, 2011).

En la provincia Chiclayo departamento de Lambayeque, recientemente se evidencio que el 9% de 100 muestras de caballos con antecedentes de garrapatas presentaron estructuras compatibles con cuerpos de inclusión o mórulas de *Anaplasma phagocytophilum* observados mediante frotices de sangre periférica teñidos con Wright y Naranja de acridina, siendo este estudio el primer reporte de este agente en caballos (Masgo, 2018).

En el Perú, el primer trabajo en nuestro país indico la presencia de ADN de *A. platys* en 1.4% en 2/144 muestras de sangre de perros con signos compatibles a Anaplasmosis, además de encontrar que el 29.2 % y el 12.5% de 144 canes con sintomatología clínica compatible con

anaplasmosis fueron positivos y sospechosos a la enfermedad, respectivamente, de acuerdo con la presencia de trombocitopenia y corpúsculos de inclusión en plaquetas (Tateishi *et al.*, 2015).

2.4.3 Borreliosis canina

2.4.3.1 Taxonomía

La Borreliosis canina o enfermedad de lyme es una enfermedad zoonótica causada por bacterias espiroquetas que pertenecen al género *Borrelia*, familia Spirochaetaceae y orden Spirochaetales, estas bacterias son móviles, tienen forma de espiral, miden aproximadamente 25 µm de largo y solo 0.2 µm de diámetro (Krupka y Straubinger, 2010).

El género *Borrelia* incluye una variedad de especies, todas las especies se transmiten por las garrapatas del género *Ixodes* spp., se han descrito diecinueve genoespecies conocidas que se agrupan en el complejo *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Comúnmente, la distribución mundial de esta enfermedad sigue áreas endémicas de garrapatas del género *Ixodes* spp: zonas climáticas de humedad y temperatura moderadas y una vegetación de bosques mixtos a caducifolios y matorrales (Day, 2016).

2.4.3.2 Etiología y epidemiología

Los animales reservorios cumplen un rol importante en la distribución de la enfermedad, en el noreste y el medio oeste superior de Estados Unidos el ratón de patas blancas, *Peromyscus leucopus*, puede albergar grandes cantidades del organismo sin signos evidentes de enfermedad, así como también musarañas y ardillas. En el oeste de los Estados Unidos, la ardilla gris occidental es el principal reservorio (Brisson *et al.*, 2008). Los roedores pequeños, como las ardillas, parecen ser un importante reservorio de *B. afzelii*, y las aves como el mirlo y los zorzales son importantes reservorios de *B. garinii* en Europa (Hanincova *et al.*, 2003).

Las garrapatas se infectan al alimentarse de los reservorios durante su ciclo biológico (Figura 8) que dura de 2 - 3 años. Las larvas de garrapatas se infectan cuando se alimentan de pequeños mamíferos como roedores, topes, ardillas, pájaros o incluso lagartijas durante el primer año de vida. Las larvas se transforman en ninfas y posteriormente se alimentan de mamíferos más grandes como ciervos, alces, perros, gatos, humanos y caballos, en esta etapa tienen 2 a 3 mm de diámetro, esta fase puede ser una fuente importante de infección por lo que son difíciles de observar, las ninfas no infectadas pueden infectarse al alimentarse cerca de otras infectadas. Las

hembras adultas grávidas después de alimentarse de mamíferos grandes como ciervos, perros o humanos caen al suelo donde depositan 3000 huevos (Krupka y Straubinger, 2010; Little *et al.*, 2010).

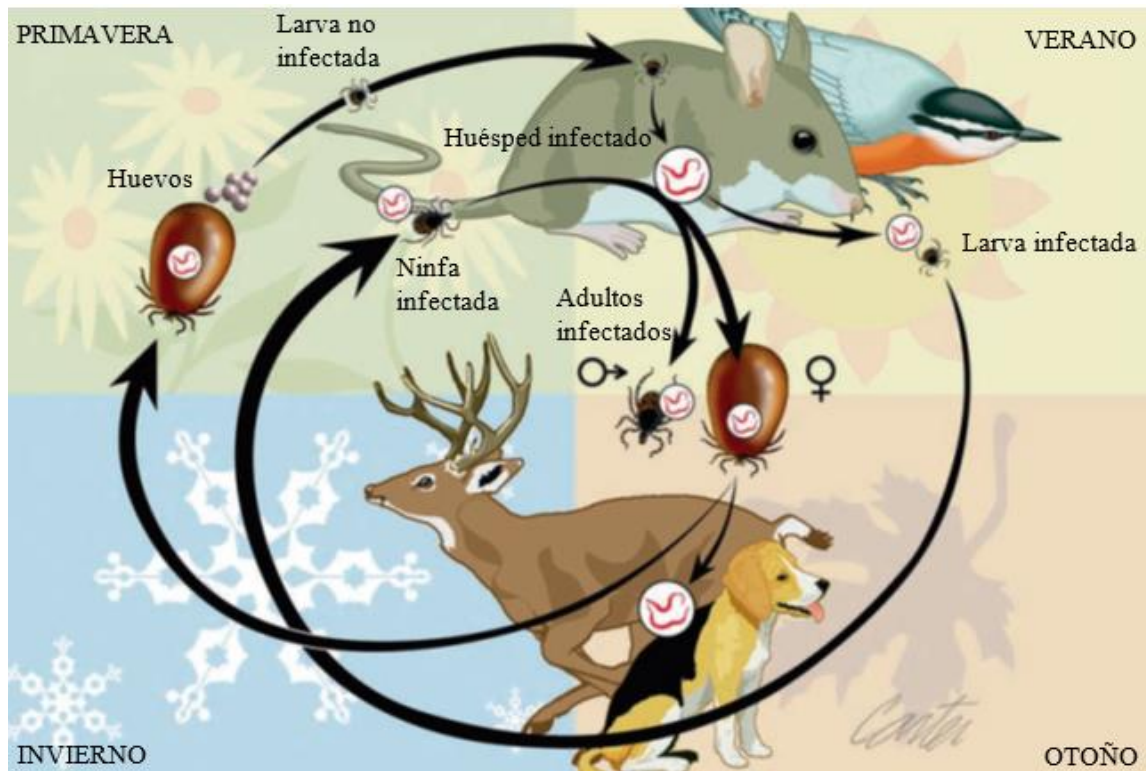


Figura 8. Ciclo biológico de *Ixodes escapularis*, vector de *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Greene, 2012).

En Norteamérica, borreliosis canina es causada por *Borrelia burgdorferi sensu stricto* que es patógena en humanos y perros, mientras que en Europa y Asia, otras especies que pertenecen a *Borrelia burgdorferi sensu lato* son más importantes, específicamente *Borrelia afzelii* y *Borrelia garinii* que son patógenas en humanos (May *et al.*, 1990; Steere, 2001). Todavía falta demostrar si las especies *B. afzelii* y *B. garinii* produzcan enfermedad en perros, a pesar que se haya encontrado ADN de estas especies en perros infectados de forma natural (Hovius *et al.*, 1999; Speck *et al.*, 2001).

2.4.3.3 Patogenia

La transmisión ocurre con la picadura de la garrapata durante un mínimo de 24 horas, pero en algunos casos la transmisión puede ocurrir en un tiempo menor (Berger *et al.*, 1995; Hynote *et al.*, 2012). Durante este tiempo, las espiroquetas se someten a un proceso complejo en la remodelación de la superficie externa para sobrevivir más tarde en el hospedero

inmunocompetente, un mamífero, un activador de este proceso es probablemente el aumento de la temperatura, que la garrapata experimenta durante la ingesta de sangre, la virulencia de esta bacteria depende en cierta medida al cambio de sus proteínas de la superficie externa Osp, de OspA a OspC (Schwan *et al.*, 1995).

No todas las espiroquetas en una garrapata completan el proceso de cambio de sus proteínas de la superficie externa de OspA a OspC. Algunas espiroquetas todavía expresan OspA, se demostró que las bacterias presentadoras de OspA no pueden resistir la respuesta inmune del hospedero (Wilske *et al.*, 1996; Ohnishi *et al.*, 2001). Se demostró que la OspC es esencial para que las espiroquetas penetren en el intestino medio de la garrapata y establezcan una infección en el hospedero vertebrado (Grimm *et al.*, 2004; Templeton, 2004). Otro factor importante, la proteína salival de la garrapata (Salp15) se une y cubre a esta espiroqueta recubierta con OspC en la garrapata y la protege contra los ataques del sistema inmune del hospedero aproximadamente 24 a 48 horas después de la picadura inicial de la garrapata (Piesman *et al.*, 1997; Ohnishi *et al.*, 2001).

Esta bacteria se replica en el punto de unión con el hospedero, luego se disemina, aunque se puede encontrar transitoriamente en la sangre, este organismo se replica principalmente y se propaga a través del tejido conectivo, se une a proteínas como el plasminógeno, las integrinas $\beta 3$ como la integrina plaquetaria $\alpha \text{IIb}\beta 3$, los glicosaminoglicanos, la fibronectina, la laminina y la decorina (Antonara *et al.*, 2011). Después de la invasión, el organismo puede persistir en los perros durante más de un año, a través de la evasión de las respuestas inmunes del hospedero (Summers *et al.*, 2005).

Con el fin de persuadir la respuesta inmune del huésped, las espiroquetas producen otra lipoproteína de membrana externa llamada VlsE (secuencia de proteína variable expresada), la cual provoca que la secuencia de aminoácidos de la estructura varíe rápidamente dentro de los días posteriores a la infección (Embers *et al.*, 2007). Se demostró que los clones que no pueden cambiar la secuencia VlsE tan rápidamente como otros clones, son preferentemente reconocidos y eliminados por el sistema inmune, esto es debido a que la producción de anticuerpos específicos contra variantes antigénicas que cambian rápidamente ocurre mucho más lentamente en el hospedero (Coutte *et al.*, 2009).

Por otro lado, VlsE no se expresa en la espiroqueta que se encuentra en la garrapata (Indest *et al.*, 2001). Esto determina a VlsE y sus regiones constantes como el péptido IR6 o C6

como una herramienta de diagnóstico específica para detectar anticuerpos contra esta espiroqueta especialmente en humanos y perros (Liang y Philipp, 1999).

2.4.3.4 Signos clínicos

Comparada con la enfermedad de borreliosis en humanos, las fases clínicas de la enfermedad en perros no se pueden dividir claramente en 3 etapas, los perros no desarrollan una erupción cutánea temprana (eritema migratorio). Se ha estimado que solo el 10% de los perros afectados muestran signos evidentes de enfermedad. Los signos iniciales en perros ocurren de 2 a 5 meses después de una picadura de garrapata y consisten en fiebre variable, inapetencia, trombocitopenia y cojera debido a la poliartritis neutrofílica (Straubinger *et al.*, 1997). En un estudio de perros infectados experimentalmente, la artritis es el síndrome más evidente documentado (Figura 9), siendo la primera articulación afectada, la más cercana al sitio de la picadura de la garrapata, lo que respalda la idea de que las espiroquetas llegan a las articulaciones como resultado de la propagación a través del tejido conectivo (Summers *et al.*, 2005; Susta *et al.*, 2012).

En perros infectados naturalmente, se observó la reaparición intermitente de cojera asociada con fatiga, dolor en los movimientos al subir o bajar escaleras y aumento moderado de la temperatura corporal. Un hallazgo importante es la asociación de la artropatía causada por rotura de ligamentos cruzados en perros que viven en áreas endémicas, donde se encontró un incremento de ADN bacteriano en biopsias sinoviales (Muir *et al.*, 2007).



Figura 9. Artritis causada por borreliosis inducida experimentalmente en perros. (A) extremidad torácica en perro de raza beagle y (B) extremidad pélvica en un sabueso (Greene, 2012).

En otro estudio donde se evaluó perros infectados naturalmente, se describió la glomerulonefritis con pérdida de proteínas para ciertas razas (Grauer *et al.*, 1988). Los signos clínicos resultan de proteinuria e insuficiencia renal incluyen inapetencia, letargo, pérdida de peso, vómitos y poliuria y polidipsia. Las razas de golden retriever, labrador retriever, pastores de Shetland y los perros de montaña berneSES parecen estar predispuestas (Dambach *et al.*, 1997; Littman *et al.*, 2006; Barth *et al.*, 2012).

La causa de esta enfermedad renal es incierta; se han propuesto mecanismos inmunomediados (Hutton *et al.*, 2008). El ADN o el antígeno de la espiroqueta no se puede detectar de manera consistente dentro de las biopsias renales (Chou *et al.*, 2006). Los depósitos subendoteliales de IgM, IgG y C3 se pueden detectar dentro de los glomérulos (Dambach *et al.*, 1997).

2.4.3.5 Diagnostico

El diagnóstico de la borreliosis canina es notoriamente difícil. La gran mayoría de los perros infectados experimentan una infección subclínica, después de lo cual los títulos de anticuerpos positivos pueden persistir durante meses o años. Debido a que solo un pequeño porcentaje de las infecciones da como resultado la enfermedad, es importante distinguir entre el diagnóstico de infección o la exposición previa a la espiroqueta y el diagnóstico de la enfermedad de borreliosis. Los perros con títulos de anticuerpos positivos pueden desarrollar enfermedades no relacionadas, lo que resulta en un diagnóstico confuso. Al igual que en pacientes humanos, el

diagnóstico debe establecerse en función de los signos clínicos característicos, un historial de exposición en un área endémica y una respuesta de anticuerpos positiva a *B. burgdorferi* (Steere, 2010).

2.4.3.6 Evaluación hematológica

El hallazgo más común en la evaluación hematológica de perros con poliartritis o nefritis causada por borreliosis es la trombocitopenia leve a moderada, por otro lado, la anemia y la leucocitosis leve a moderada debido a una neutrofilia madura pueden estar presentes en perros con nefritis, sin embargo, los recuentos de glóbulos blancos se presentan normales. Además, se puede presentar linfopenia y neutropenia leve (Sykes, 2014).

2.4.3.7 Serología

Las pruebas serológicas para anticuerpos son los principales ensayos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme en humanos y también en perros, pero es fundamental reconocer que la serología positiva no necesariamente equivale a la presencia de la enfermedad de Lyme. Por otra parte, los métodos de detección directa, como el cultivo o la microscopía, necesitan un largo periodo y a menudo no son lo suficientemente sensibles, debido a que la carga bacteriana en las muestras de tejido o fluidos corporales es comúnmente baja (Krupka y Straubinger, 2010).

Entre las pruebas serológicas disponibles se incluyen ELISA de células enteras, ensayos de inmunofluorescencia (IFA) y Western blot (WB). WB ha sido considerado tradicionalmente como prueba de oro, por otro lado, los falsos positivos con ELISA de células enteras e IFA tienen el potencial de aparecer en pacientes con otras infecciones por espiroquetas, con otros trastornos inflamatorios y en perros vacunados (Steere, 2010). Pacientes con resultado positivo para IgM o IgG con ELISA se somete a WB, debido a su alta especificidad. WB se ha utilizado para diferenciar la respuesta a la inmunización y la infección natural en perros, sin embargo, el diagnóstico por WB requiere más tiempo que ELISA e IFA y se requiere experiencia para su interpretación (Leschnik *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2011).

Se ha comercializado un ensayo de múltiples perlas fluorescentes en América del Norte para la detección de anticuerpos contra tres antígenos de *B. burgdorferi*: OspA, OspC y OspF. El ensayo utiliza pequeñas perlas a las que se unen OspA, OspC y OspF. Se agrega suero de perro a las perlas, y si está presente, los anticuerpos en el suero se unen a los antígenos y se pueden

detectar usando un conjugado fluorescente (Wagner *et al.*, 2011). La presencia de anticuerpos anti-OspA sugiere una vacunación previa, OspC se expresa cuando la espiroqueta se mueve hacia las glándulas salivales de las garrapatas y poco después ingresa al hospedero, es decir, una respuesta de anticuerpos a OspC puede sugerir una infección reciente, además se demostró su presencia 3 semanas después de la infección experimental de perros (Wagner *et al.*, 2012), en cambio OspF se expresa en infecciones más crónicas, se detecta después de 5 semanas de infección y puede detectarse junto con la respuesta de anticuerpos C6 en perros expuestos de forma natural. Sin embargo, el rendimiento del ensayo de perlas fluorescentes aún no se ha evaluado exhaustivamente en perros infectados naturalmente (Magnarelli *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2012).

Un nuevo ensayo serológico basado en disco de silicio está disponible en los Estados Unidos para la detección de anticuerpos contra *B. burgdorferi*, *E. canis* y *A. phagocytophilum* y antígeno contra *Dirofilaria immitis* (Accuplex4, Antech Diagnostics, Irvine, CA). El ensayo para *B. burgdorferi* detecta anticuerpos contra las proteínas OspA, OspC, OspF, P39 y SLP. El empleo de estas proteínas puede diferenciar entre las respuestas de infección natural, vacunación, infección aguda y crónica (Moroff *et al.*, 2015).

Actualmente, una de las pruebas de serodiagnóstico más utilizadas para la borreliosis canina se basa en un ELISA, que detecta anticuerpos contra la secuencia C6 de la lipoproteína VlsE. Esta secuencia peptídica C6 se encuentra en la región IR6 de la lipoproteína VlsE, y se encuentra en todas las genoespecies del complejo *B. burgdorferi sensu lato* (Liang *et al.*, 2000a). El ensayo ELISA C6 detecta los anticuerpos IgG de 3 a 5 semanas después del momento de la infección, por lo que cuando los perros desarrollan signos clínicos son casi siempre seropositivos, y es negativo en perros que han sido vacunados contra la borreliosis canina, porque el antígeno no es expresado por organismos utilizados en las vacunas de Lyme (Liang *et al.*, 2000b).

La prueba ELISA C6 está disponible en la práctica clínica veterinaria, en combinación con detección de anticuerpos para *E. canis* / *E. ewingii*, *A. phagocytophilum* / *A. platys* y antígeno para *Dirofilaria immitis* (SNAP 4Dx Plus, IDEXX Laboratories) (Stillman *et al.*, 2014). A pesar de su alta especificidad, los anticuerpos C6 no se correlacionan necesariamente con los signos clínicos en el perro, por lo que el tratamiento debe ser evaluado con cuidado (Eschner, 2008).

2.4.3.8 Técnicas moleculares

Los ensayos de PCR se realizan mejor en muestras de biopsia de piel recolectadas de una región adyacente al sitio de la picadura de la garrapata. En pacientes humanos, el uso de ensayos de PCR para el diagnóstico de la borreliosis en sangre tiene baja sensibilidad, por lo que los falsos negativos son comunes. El líquido sinovial o las biopsias de membrana sinovial pueden ser la muestra óptima para el diagnóstico de la artritis debido a borreliosis en perros. Esto también es cierto en pacientes humanos (Schwaiger *et al.*, 2001). Sin embargo, en un estudio de perros infectados experimentalmente, la prueba de PCR del líquido sinovial fue insensible (Susta *et al.*, 2012). La sensibilidad y especificidad de las pruebas de PCR cuando se realizan en muestras como líquido sinovial para el diagnóstico de la borreliosis canina necesita más estudios.

2.4.3.9 Estudios de Borreliosis canina en el Perú.

En lo que respecta a caninos domésticos, en Perú solo se ha determinado la presencia de anticuerpos de *B. burgdorferi* en 2 perros, uno de los cuales fue recogido de la calle en el distrito de Santa Anita, Lima, y el otro nació y vivió en EE. UU. por varios años, teniendo sólo un año de residencia en Lima, sin embargo, en ambos casos no se reportan historial de garrapatas (Rubio *et al.*, 2011).

Por otro lado, en Piura un estudio serológico en humanos determinó la presencia de 3 personas positivas anticuerpos de *B. burgdorferi* de un total de 35 agricultores, este experimento se realizó mediante una prueba ELISA (kig Sigma Diagnostic, MO-USA) que detecta IgM e IgG, además los agricultores fueron considerados como grupo de riesgo para borreliosis, por el tipo de actividad laboral que realizan y por la presencia de *Haemaphysalis leporispalustris* e *Ixodes* spp. en Piura (Macedo *et al.*, 1992).

Otro estudio realizado en 232 sueros humanos de los departamentos de Amazonas y Piura mediante la prueba ELISA Captia Lyme IgG/IgM (Trinity biotech), determinó una prevalencia de 9.9% de anticuerpos *B. burgdorferi*, además en ese mismo trabajo se identificó a garrapatas del género *Ixodes* y *Amblyomma* consideradas vectores de borreliosis (Glenny *et al.*, 2004).

2.4.4 Dirofilariasis canina

2.4.4.1 Taxonomía

La dirofilariasis canina o enfermedad del gusano del corazón es una enfermedad zoonótica causada por el nematodo *Dirofilaria immitis*, pertenecen a la familia Onchocercidae y a la subfamilia Dirofilarinae del orden Spirurida (Anderson, 2000). Los gusanos machos en su etapa adultos miden de 12 a 20 cm de largo, en cambio las hembras miden de 25 a 31 cm de largo, estos gusanos son ovovivíparos, las hembras liberan microfilaras en el torrente sanguíneo, las cuales presentan 290- 330 μm de largo y 5-7 μm de ancho; la extremidad cefálica es cónica, la cola es puntiaguda y recta (Abraham *et al.*, 1988). Los cánidos (perros domésticos, coyotes, zorros, lobos y otros cánidos salvajes) son los hospederos definitivos de este gusano, sin embargo, el parásito también ha sido encontrado en más de 30 especies de animales, incluidos gatos domésticos y felinos salvajes, focas, leones marinos, hurones, osos y humanos (Thomas, 2012).

2.4.4.2 Etiología y epidemiología

El nematodo *Dirofilaria immitis* en perros produce una infección de las arterias pulmonares y del lado derecho del corazón, el ciclo natural y la transmisión de estos nematodos requiere un reservorio de infección llamado hospedero, los perros domésticos y ferales, así como los cánidos salvajes; un vector mosquito hematófago, es decir hembras de varias especies de mosquitos pertenecientes al género *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Anopheles*, *Armigeres* y *Mansonia*, según el área geográfica, mientras que *Aedes vexans*, *Culex pipiens* y *Aedes albopictus* han sido implicados como los vectores más comunes (Cancrini *et al.*, 2007; Capelli *et al.*, 2013). Un factor importante es el clima, el cual debe ser cálido para permitir la presencia de mosquitos y el desarrollo de estadios larvarios en los insectos (Simon *et al.*, 2009).

En los humanos, el gusano no llega a la etapa adulta, solo se da la microfilaremia de *D. immitis* que se localizan principalmente en los tejidos subcutáneos, pero también en los vasos pulmonares y en el sistema nervioso central, causando principalmente un resultado asintomático o síntomas raramente fatales (Genchi *et al.*, 2011; Otranto y Eberhard, 2011; Simon *et al.*, 2012).

Este nematodo es endémico en América del Norte, Central y del Sur; las islas caribeñas; las regiones costeras de África, el sur de Europa y Asia, Japón; Indonesia, y Australia (Vezzani *et al.*, 2011). Se evidencian vectores de mosquitos y condiciones climáticas presentes en las regiones del centro de Alaska para apoyar la transmisión de gusanos del corazón durante breves

períodos (Terrell y Courtney, 1998; Darsie y Ward, 2005). En contraste, en la actualidad la prevalencia ha aumentado significativamente en áreas donde el gusano del corazón aparentemente se ha extendido más recientemente, como Europa central y nororiental (Genchi y Kramer, 2019).

2.4.4.3 Ciclo biológico

El ciclo biológico de *D. immitis* (Figura 10), tiene una duración 7 a 9 meses, los mosquitos hembra hematófagos se alimentan de un hospedero canino infectado, es decir microfilarémico, cuando ingieren aproximadamente 5 μ L de sangre ingresan de 5 hasta 500 microfilarias. Las microfilarias ingeridas son larvas de primera etapa (L1), la L1 sufrirá dos mudas en las próximos 10 – 28 días en los túbulos de Malpighi del mosquito en el cual se convertirá en tercera etapa (L3), en esta etapa los mosquitos salen de túbulos de Malpighi y migran a través de la hemolinfa a la cabeza y la base de las piezas bucales (Kotani y Powers, 1982). Cuando el mosquito se alimenta nuevamente, la larva L3 abandona las piezas bucales y entra en la herida de la picadura, se instala en la piel dentro de 3 – 4 días posteriores a la infección donde cambia la cuarta etapa (L4). La L4 migra a tejido subcutáneo y al músculo hacia el tórax, es ahí donde cambian a una quinta etapa (L5) o juveniles en aproximadamente 50 - 70 días después de la infección inicial (Thomas, 2012; Bowman, 2014).

En el corazón y las arterias pulmonares, las larvas L5 o juveniles se convierten en adultos sexualmente maduros en aproximadamente 120 – 210 días, las hembras comienzan a liberar en circulación microfilarias que tienen aproximadamente 300 μ m de largo y 5 μ m de ancho (Mullen y Durden, 2019). Los machos adultos maduros tienen una longitud de 15 a 18 cm y las hembras de 25 a 30 cm con una esperanza de vida de 5 a 7 años (Rawlings, 1986).

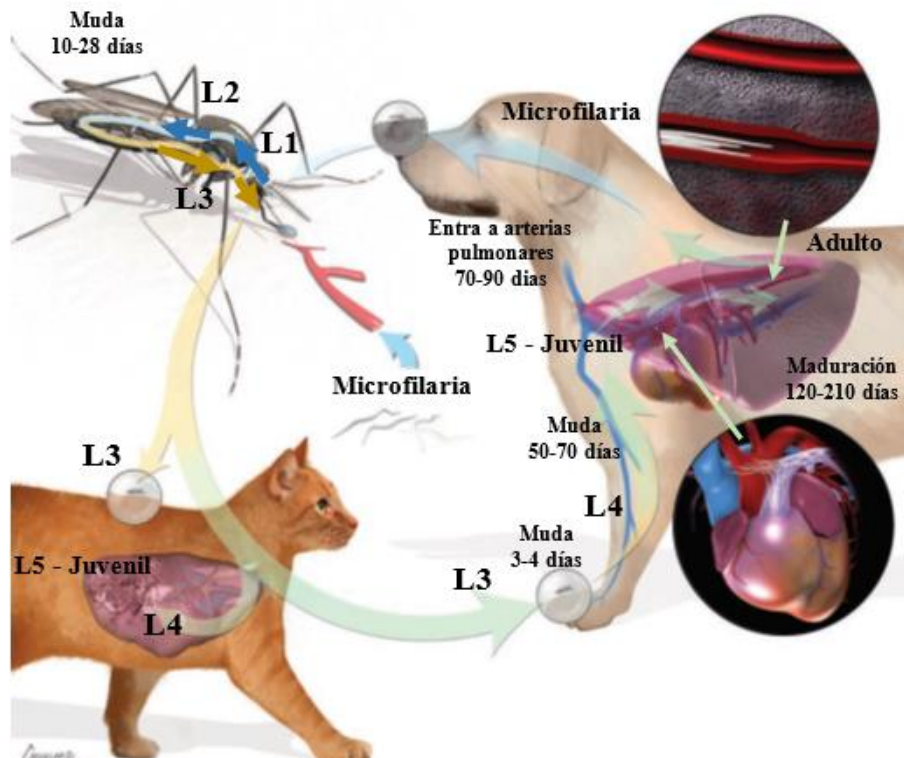


Figura 10. Ciclo biológico de *Dirofilaria immitis* en perros y gatos (Thomas, 2012).

En los gatos la infección por este nematodo generalmente se limita a la etapa juvenil. En gatos atendidos en Texas y Carolina del Norte, la enfermedad del gusano del corazón con gusanos adultos se diagnosticó en 9 de cada 100 gatos con signos cardiorrespiratorios, los 100 gatos de Texas y Carolina del Norte, el 26% tenía anticuerpos contra *D. immitis*, lo que sugiere que habían sido anfitriones de larvas de tercera etapa que no maduraron completamente (Atkins *et al.*, 1998).

2.4.4.4 Patogenia

El daño principal de este nematodo se encuentra en el pulmón, debido a la presencia de gusanos adultos en las arterias pulmonares la cual provoca lesiones vasculares que reducen la distensibilidad y el tamaño de la luz vascular. Los gusanos juveniles cuando ingresan a los vasos pulmonares producen daño endotelial, proliferación vellosa, activación y atracción de leucocitos y plaquetas que liberan factores que inducen la proliferación de células musculares lisas con acumulación de colágeno y posterior fibrosis (Calvert y Losonsky, 1985).

Comúnmente los gusanos se ubican dentro del árbol vascular pulmonar caudal, sin embargo, en ocasiones pueden dirigirse hacia las arterias pulmonares principales, el corazón derecho e inclusive hacia las grandes venas, pero lo último mencionado solo ocurre en grandes infecciones (Bowman y Atkins, 2009).

La gravedad de la enfermedad se ve afectada por la carga parasitaria y la duración de la infección; aunque también guarda relación directa con la actividad física del perro. Los perros en los que se implantaron quirúrgicamente 50 gusanos y se les restringió el ejercicio, la enfermedad clínica demora en presentarse, así como también se observó menos resistencia vascular pulmonar, en comparación con los perros infectados con 14 gusanos del corazón a los que si se les permitió la realización moderada de ejercicio (Dillon *et al.*, 1995a).

Mientras que los gusanos del corazón vivos pueden causar endarteritis (inflamación de las paredes de las arterias) e hipertrofia muscular de las paredes de las arteriolas, principalmente de las arterias pulmonares caudales, los cambios patológicos observados en la enfermedad clínica son principalmente el resultado de los efectos de los gusanos del corazón muertos. Cuando los gusanos mueren naturalmente o debido a la aplicación de adulticidas, se descomponen (Bowman y Atkins, 2009). Pequeños fragmentos de gusanos se instalan en la arteriola pulmonar distal, así como en los lechos capilares en los lóbulos pulmonares caudales, bloqueando el flujo sanguíneo. Dichos fragmentos de gusanos ocasionan tromboembolismo pulmonar, durante períodos de mayor actividad física, el incremento del flujo sanguíneo a estos vasos bloqueados produce la ruptura de capilares frágiles, conllevando a producir una hemorragia pulmonar y posterior fibrosis (Dillon *et al.*, 1995b).

Esta fibrosis, junto con la liberación de sustancias vasoactivas por los gusanos del corazón, aumenta la resistencia vascular pulmonar y la hipertensión pulmonar posterior, produciéndose el *cor pulmonale* y la posible insuficiencia cardíaca derecha (Kitoh *et al.*, 2001).

Debido a la migración aberrante de gusanos puede ocurrir lesiones en el ojo, el sistema nervioso central, la cavidad abdominal y la circulación sistémica, sin embargo, no son comunes. El síndrome de la vena cava que ocurre en un pequeño porcentaje de casos es el resultado de la migración de un gran número de gusanos del corazón desde las arterias pulmonares enfermas hasta el ventrículo derecho, la aurícula derecha y/o las venas cava lo que conlleva que la válvula tricúspide no se cierre apropiadamente, es decir se produce una regurgitación de la válvula tricúspide moderada a severa (Strickland, 1998).

El inmenso volumen de sangre en la aurícula derecha y la vena cava caudal, seguida con una elevación significativa de la presión venosa y dificultad en la circulación de retorno, generalmente conduce a la muerte del animal debido a hemólisis, hemoglobinuria y coagulación intravascular diseminada (CID) (Simon *et al.*, 2012).

La patogenia de esta enfermedad podría ser modulada por la bacteria intracelular endosimbionte obligada *Wolbachia pipientis*, que alberga *D. immitis*, que es parte integral de su crecimiento y desarrollo. Esto implicaría endotoxinas bacterianas generando la respuesta inmune del hospedero a una proteína importante de la superficie (WSP) de *Wolbachia*, contribuyendo a la enfermedad renal inmunomediada (McHaffie, 2012; Morchon *et al.*, 2012). Sin embargo, en un estudio que evaluó la relación entre *W. pipientis* y la patología pulmonar en animales infectados con gusanos del corazón, no se determinó diferencias significativas en la magnitud de las lesiones en perros infectados (Dingman *et al.*, 2010).

La infección por este nematodo también causa disfunción renal severa. Las alteraciones en la membrana basal glomerular en la enfermedad del gusano del corazón traen como resultado una glomerulonefritis membranosa (Grauer *et al.*, 1987; Ludders *et al.*, 1988). La glomerulonefritis se asocia con la formación de inmunocomplejos estimulados por antígenos de larvas, gusanos adultos y además de la presencia de microfilarias que exacerban la afección. La proteinuria con insuficiencia renal y azotemia conlleva a que las lesiones renales pueden progresar a nefrosis severa (Paes-de-Almeida *et al.*, 2003).

2.4.4.5 Signos clínicos

Los perros infectados con gusanos del corazón por lo general no muestran signos clínicos. Sin embargo, los signos clínicos que se presentan en una etapa severa de esta enfermedad dependen de la gravedad y la duración de la infección, que por lo general refleja el impacto del parásito en los pulmones, las arterias pulmonares y el corazón. En los hallazgos de la historia clínica de un perro infectado se observa pérdida de peso, intolerancia al ejercicio, letargo, tos, disnea, síncope y distensión abdominal (Thomas, 2012). Se elaboró un cuadro de los signos clínicos (Cuadro 3), con el fin de evaluar estrategias en el tratamiento y la prevención de la enfermedad (Thomas, 2012).

Es frecuente que los perros presenten una tos persistente, crónica e improductiva, que se incrementa con el aumento de la actividad física, seguida de disnea moderada o grave y/o taquipnea por estrés. A medida que la enfermedad progresa también lo hace la insuficiencia respiratoria (Simon *et al.*, 2012). A medida que la enfermedad progresa y la patología pulmonar empeora, aparecen signos asociados con insuficiencia cardíaca derecha como la distensión venosa yugular, generalmente acompañada de hepatomegalia, esplenomegalia y ascitis (Bowman y Atkins, 2009).

Cuadro 3. Resumen de signos clínicos de la enfermedad del gusano del corazón en perros (Thomas, 2012).

Infección temprana	Sin signos.
Enfermedad leve	Tos.
Enfermedad moderada	Tos, intolerancia al ejercicio, ruidos pulmonares alterados.
Enfermedad severa	Tos, intolerancia al ejercicio, disnea, ruidos anormales del corazón y los pulmones, hepatomegalia, síncope y ascitis.
Síndrome de la vena cava	Inicio repentino de letargo severo y debilidad acompañado de hemoglobinemia y hemoglobinuria.

2.4.4.6 Diagnostico

Teniendo en cuenta la presencia de los mosquitos vectores, el clima del lugar de procedencia, signos clínicos, así como también la historia clínica del paciente, se debe evaluar a la enfermedad del gusano del corazón como un posible diagnóstico, posterior confirmación con detección indirecta o directamente de *D. immitis*.

2.4.4.7 Identificación de microfilarias

Las microfilarias se pueden identificar microscópicamente mediante el examen directo de una gota de sangre con anticoagulante, con técnicas de concentración con un filtro Millipore, o con el procedimiento de Knott-modificado. Es común que no se observen microfilarias en el 80% de los perros infectados con gusanos del corazón. Este tipo de infecciones consideradas "ocultas" pueden ocurrir como resultado de infecciones de gusanos de un solo sexo, interrupción de la reproducción debido a la respuesta inmune del hospedero, o si el perro ha sido dosificado con una lactona macrocíclica contra el gusano del corazón (McCall, 2005).

Los métodos de examen directo son insensibles cuando hay números bajos a 50–100/mL microfilarias en sangre; sin embargo, estos pacientes tienen un riesgo menor de sufrir una reacción grave si son tratados inmediatamente con un microfilaricida. Por otro lado, la prueba de Knott modificada sigue siendo un excelente método para observar la morfología y medir las

dimensiones corporales para diferenciar *D. immitis* que presenta 295 - 325 μm de largo, 6 μm de ancho y una cola recta con *Acanthocheilonema reconditum*, anteriormente llamada *Dipetalonema reconditum*, de 250 - 288 μm de largo, menos de 6 μm de ancho y cola curva (Figura 11) (Nelson *et al.*, 2020).

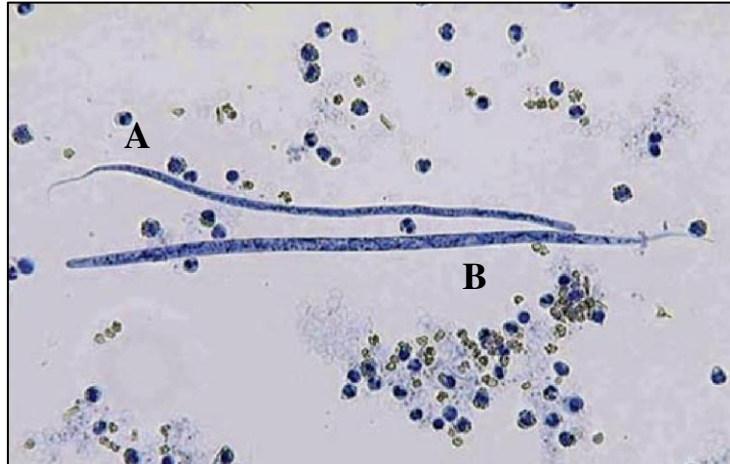


Figura 11. Microfilarias: (A) *Acanthocheilonema reconditum* y (B) *Dirofilaria immitis* (Thomas, 2012).

2.4.4.8 Serología

La detección de antígenos es el método recomendado para el diagnóstico de la enfermedad del gusano de corazón en perros, el diagnóstico de la infección se basa en una glucoproteína que se encuentra predominantemente en el tracto reproductivo del gusano hembra madura de *D. immitis*, es decir 7 meses después de la infección (Courtney y Cornell, 1990; Goodwin, 1998). Otro punto importante relacionado al tiempo en el que una *Dirofilaria* hembra llega a la madurez después de la infección, es que tiene una relación directa con la presencia de microfilarias, esto quiere decir que se podrá observar microfilarias en el examen directo. Actualmente se recomienda que las pruebas de microfilaria se realicen en conjunto con las pruebas de antígeno (Nelson *et al.*, 2020).

Los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) basados en antígenos han estado disponibles durante 35 años, se han realizado muchos estudios para investigar la sensibilidad y la especificidad estas pruebas, en las que se utiliza el examen de necropsia para confirmar el estado de la enfermedad (Brunner *et al.*, 1988; Courtney y Zeng, 2001a; Courtney y Zeng, 2001b).

Un estudio realizado en perros ha demostrado las limitaciones de la especificidad del ensayo de detección de antígeno en test comercial para *D. immitis*, debido a la reacción cruzada

con otras filarias vasculares: *D. repens* y *Angiostrongylus vasorum*, y el nematodo *Spirocera lupi* (Schnyder y Deplazes, 2012; Aroch *et al.*, 2015; Venco *et al.*, 2017). Dichas pruebas de detección antígenos secretorios/excretorios de parásitos vivos en solución salina como *Toxocara canis*, *T. cati*, *Toxocara spp.*, *Dipylidium caninum*, *Taenia teaniaeformis* reaccionan cuando se realizan con ciertos kits (Venco *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha demostrado que perros sometidos a un tratamiento reciente con una lactona macrocíclica deja el antígeno de *D. immitis*, circulante retenido obteniéndose resultados falsos negativos (Martini *et al.*, 1996; Rohrbach *et al.*, 2011).

Recientemente en un estudio en perros donde se evaluó 6 kits comerciales para la detección de antígenos de *Dirofilaria immitis* en caninos, donde se confirmó la infección mediante necropsia, las pruebas fueron: Anigen Rapid One Step® (Bio note), SNAP® 4Dx Plus (IDEXX-Laboratories.), WITNESS® (Zoetis), VetScan® (Abaxis), Solo Step® CH (Heska), y un ELISA de microplaca (DiroCHEK®; Zoetis) que se usa como prueba confirmatoria, fue evaluada frente a cada una de las pruebas antes mencionadas. Todas las pruebas comerciales de detección rápida fueron altamente precisas y sensibles (Cuadro 4). Las pruebas fueron evaluadas frente a 200 perros positivos verificados por necropsia y 50 negativos. (Henry *et al.*, 2018).

Cuadro 4. Sensibilidad y especificidad de cinco kits comerciales para la detección de anticuerpos para *Dirofilaria immitis* (Henry *et al.*, 2018).

Prueba	Sensibilidad (%) (I.C. 95%)	Especificidad (%) (I.C. 95%)
Anigen Rapid One Step	99.50	94.00
SNAP® 4Dx Plus	97.50	94.00
WITNESS	99.00	94.00
VetScan	98.50	94.00
Solo Step	98.00	94.00

2.4.4.9 Técnicas moleculares

Los métodos de detección molecular se están considerando para el diagnóstico de infección por dirofilariasis, la identificación de las especies de parásitos utilizando los enfoques tradicionales a veces puede ser difícil y puede llevar a un diagnóstico erróneo, especialmente en muestras de áreas donde están presentes *D. immitis* y *D. repens*. Se ha desarrollado una reacción en cadena de polimerasa múltiple (PCR) de un solo paso para detectar y diferenciar entre ambas especies en la cual se empleó la subunidad menor ribosomal 12S, mediante la extracción de ADN de sangre periférica canina (Gioia *et al.*, 2010). En otro trabajo se describió un análisis de fusión de alta resolución junto con un PCR en tiempo real (PCR real-time–HRMA), donde demostró ser un método más rápido y rentable para detectar y diferenciar de forma simultánea *D. immitis* y *D. repens* (Albonico *et al.*, 2014).

2.4.4.10 Estudios de la Dirofilariasis en el Perú.

En el Perú, en los distritos de Lima: Chorrillos, San Juan de Miraflores y la Molina que son colindantes con aguas naturalmente estancadas, se recolectaron 140 muestras de sangre para ser analizados mediante la prueba ELISA Snap Combo Canino de IDEXX, se determinó una prevalencia de 4.4% para perros que presentaron antígeno para *D. immitis* (Adrianzén *et al.*, 2003).

Otro estudio realizado en los distritos limeños de: San Martín de Porres, Rímac y Cercado de Lima (distritos ubicados en los márgenes del río Rímac), se obtuvo una prevalencia de 4.7% en 124 muestras de sangre de perros sin distinción de raza, sexo y edad, las cuales se sometieron a evaluación mediante el método de microcapilar, test de Knott modificado y técnica ELISA, demostrándose que la prueba enzimática de ELISA es mucho más específica para diagnosticar la enfermedad (Acuña y Chávez, 2002).

En la misma ciudad, en distritos ribereños al Río Chillón (Puente Piedra, Comas, Carabaylo, Los Olivos y Ventanilla), se indicó una prevalencia de 3% en 200 muestras de perros sin distinción de raza, sexo y edad, las cuales se analizaron mediante las pruebas del método del microcapilar, el Knott modificado para microfilarias, y la prueba de ELISA, la cual determinó una prevalencia comparada a las otras pruebas (Chipana *et al.*, 2002).

En el distrito de San Juan de Lurigancho, un estudio determinó la prevalencia de 5.5% en (6/107) caninos aparentemente sanos, mayores de 6 meses, sin distinción de raza o sexo, para esto se utilizó una prueba de ELISA (Corimanya *et al.*, 2004).

Un reciente estudio realizado en Ayacucho, en el distrito de Santa Rosa – VRAEM, el cual utilizo el método Knott modificado la cual ayuda a la identificación de las larvas (L1) o microfilarias, determinando una prevalencia de 2.4 % en (3/124) (Carlos, 2019).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución y periodo de duración

La toma de muestra se realizó en los distritos de Garbanzal, Rica Playa y Puerto Pizarro de la provincia de Tumbes, departamento de Tumbes. El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Parasitología del Centro de Salud Global de la Universidad Peruana Cayetano Heredia ubicado en Pizarro- provincia de Tumbes. El muestreo se realizó durante el mes de enero de 2020.



Figura 12. Mapa de los distritos Garbanzal, Rica Playa y Puerto Pizarro de la provincia de Tumbes, departamento de Tumbes (Fuente: el autor).

3.2 Tamaño de muestra

Los estudios sobre ETV en perros realizados en Perú, indican las siguientes prevalencias: 2 casos reportados para borreliosis canina (Rubio *et al.*, 2011), 1.4% para anaplasmosis canina (Tateishi *et al.*, 2015); 4.7% para dirofilariasis (Acuña y Chávez, 2002) y 16% para ehrlichiosis (Adrianzén *et al.*, 2003).

El cálculo del tamaño muestral se obtuvo mediante la fórmula para estimar una proporción (Dohoo *et al.*, 2003), la cual dio un resultado de 143 perros, estimando un 16% de prevalencia para ehrlichiosis debido a que con esa prevalencia se obtuvo un tamaño de muestra mayor que utilizando las prevalencias de las demás enfermedades. Asimismo, se utilizó un nivel de significancia del 95% y una precisión del 6%.

$$n = \frac{Z_a^2 \times p \times q}{d^2}$$

Donde:

Z= nivel de confianza

p= prevalencia esperada

q= 1 – p

d= precisión

Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión fueron todos los perros mayores de 3 meses provenientes del distrito de Garbanzal, Puerto Pizarro y Rica Playa, sin distinción de raza y sexo, y que cuenten con un consentimiento del dueño (Anexo 1).

Los criterios de exclusión fueron animales sin dueño debido a que el proyecto solo se ejecutó al tener consentimiento informado, perros agresivos que dificulten la toma de muestra ya que no se usó fármacos sedantes o tranquilizantes, perras preñadas en el último tercio debido al estrés que puedan presentar a la toma de muestra, y animales menores de 3 meses porque todavía pueden presentar anticuerpos maternos.

3.3 Descripción de material experimental

3.3.1 Material para toma de muestra

- Guantes de látex
- Alcohol 70°
- Algodón
- Gasa
- Agua oxigenada
- Tubos vacutainer de 4.0 ml con EDTA
- Aguja vacutainer 21G
- Jeringas de 3 y 5 ml
- Contenedor para eliminación de objetos punzocortantes
- Cinta Maskin tape
- Torniquete de uso en animales de compañía
- Bolsa de basura
- Bozal
- Tijera
- Capuchón

3.3.2 Material de oficina

- Marcadores indelebles
- Lapiceros
- Tablero oficio
- Ficha de identificación y datos de cada perro muestreado

3.3.3 Material de laboratorio

- Kit SNAP 4Dx Plus Test
- Pipeta desechable
- Tubo de ensayo desechable
- Conjugado para la muestra

3.3.4 Material biológico

Se colectó 3 ml de sangre con EDTA de perros de los distritos de Garbanzal, Rica playa y Puerto Pizarro de la provincia de Tumbes, departamento de Tumbes.

3.4 Metodología

Los distritos de Garbanzal, Rica Playa y Puerto Pizarro, así como la provincia de Tumbes fueron seleccionados al azar mediante un programa (<https://www.sortea2.com/sorteos>). El tipo de muestreo fue aleatorio simple. Debido a que no existe un censo previo del número de perros en la región, se colectaron 59 muestras de los distritos de Garbanzal y Puerto Pizarro, mientras que del distrito de Rica playa se recolectó 51 muestras debido a que presenta una población canina reducida. Se visitó cada domicilio ofreciendo una campaña sanitaria gratuita (desparasitación interna y externa), así como también informar y pedir el consentimiento para la toma de muestra de su mascota. Cabe recalcar que la campaña sanitaria gratuita se ofrecía a todos los dueños sin importar si su respuesta era negativa hacia la toma de muestra de su mascota. Se colectó aproximadamente 3 ml de sangre de la vena cefálica utilizando tubos de vacío con anticoagulante (EDTA) para sangre, así como también se elaboró una ficha para la obtención de información indicando los datos del animal como sexo, edad, procedencia, lugar de crianza, raza, evidencia de garrapatas y tipo de pelaje (Anexo 2). El estudio fue de tipo transversal. Las muestras se remitieron al Laboratorio de Parasitología del Centro para la Salud Global - Tumbes (Universidad Peruana Cayetano Heredia, Tumbes, Perú) para su procesamiento. Todas las muestras se analizaron para diagnosticar la dirofilariasis, la ehrlichiosis, la borreliosis y la anaplasmosis utilizando un kit de prueba comercial (SNAP 4Dx Plus Test, Maine, EE. UU.) (Movilla *et al.*, 2016) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.5 Toma de muestra

Para la colecta de sangre se utilizó el protocolo descrito en el libro “*McCurnin’s Clinical Textbook for Veterinary Technicians*” descrito a continuación (Bassett, 2017):

1. Un ayudante sujeta al perro en posición decúbito esternal, seguido a esto se sujetó el cuello y la cabeza del animal con una mano y con la otra mano se tomó la articulación del codo del miembro torácico que le resulte más cómodo, extendiendo el antebrazo del perro.

2. Se realizó la desinfección de la región dorsal del tercio medio distal del radio y cubito. Antes de realizar la venopunción, la persona colocó el torniquete para animales menores sobre la articulación del codo con el fin de interrumpir el retorno venoso y resaltar la vena.
3. Al realizar la venopunción se sujetó con una mano firmemente el antebrazo del perro para inmovilizarlo en el proceso de la toma de muestra.
4. Se introdujo la aguja vacutainer de 21G con el bisel apuntando hacia arriba, sujetando firmemente el capuchón, en un ángulo de 45 grados sobre la vena cefálica resaltada.
5. Una vez atravesada la piel, tejido subcutáneo y la pared del vaso sanguíneo, se introdujo en el capuchón el tubo vacutainer de 4.0 ml con EDTA.
6. Se extrajo aproximadamente 3 ml de sangre, se rotuló el tubo con el número correspondiente a su respectiva ficha clínica de cada perro muestreado.
7. Se almacenó las muestras a una temperatura de 15°C en un cooler de 5 litros con icepack hasta su procesamiento en el laboratorio.

3.6 Prueba Diagnóstica

3.6.1 Tecnología de ensayo SNAP

Las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ELISA tipo «sándwich» se usan para detectar una sustancia (típicamente un antígeno o anticuerpo) en el que una enzima está unida (conjugada) a uno de los reactivos y se usa una reacción enzimática para amplificar la señal si la sustancia está presente, es una de las tecnologías de diagnóstico más sensibles y específicas disponibles, es el método de elección en los laboratorios de referencia en todo el mundo debido a su precisión incomparable y facilidad de uso (Sainz et al., 2015).

La tecnología SNAP® 4Dx Plus es una prueba cualitativa que posee una sensibilidad del 99.1% y una especificidad del 100%, siendo la prueba de screening más recomendado en perros a partir de muestras de suero, plasma y sangre entera con anticoagulante (Nelson y Couto, 2014). Esta prueba puede llegar a evaluar posibles “coinfecciones” al detectar la presencia de anticuerpos contra *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. ewingii*, *E. canis*, *B. burgdorferi*; y antígenos frente a *D. immitis*. Este kit de prueba ELISA emplea antígenos purificados proporcionando una especificidad y sensibilidad superior respecto a los tests que emplean células enteras (IFI y Western blot) debido a su tecnología basada en péptidos SNAP (O'Connor et al., 2013; IDEXX-Laboratories., 2020).

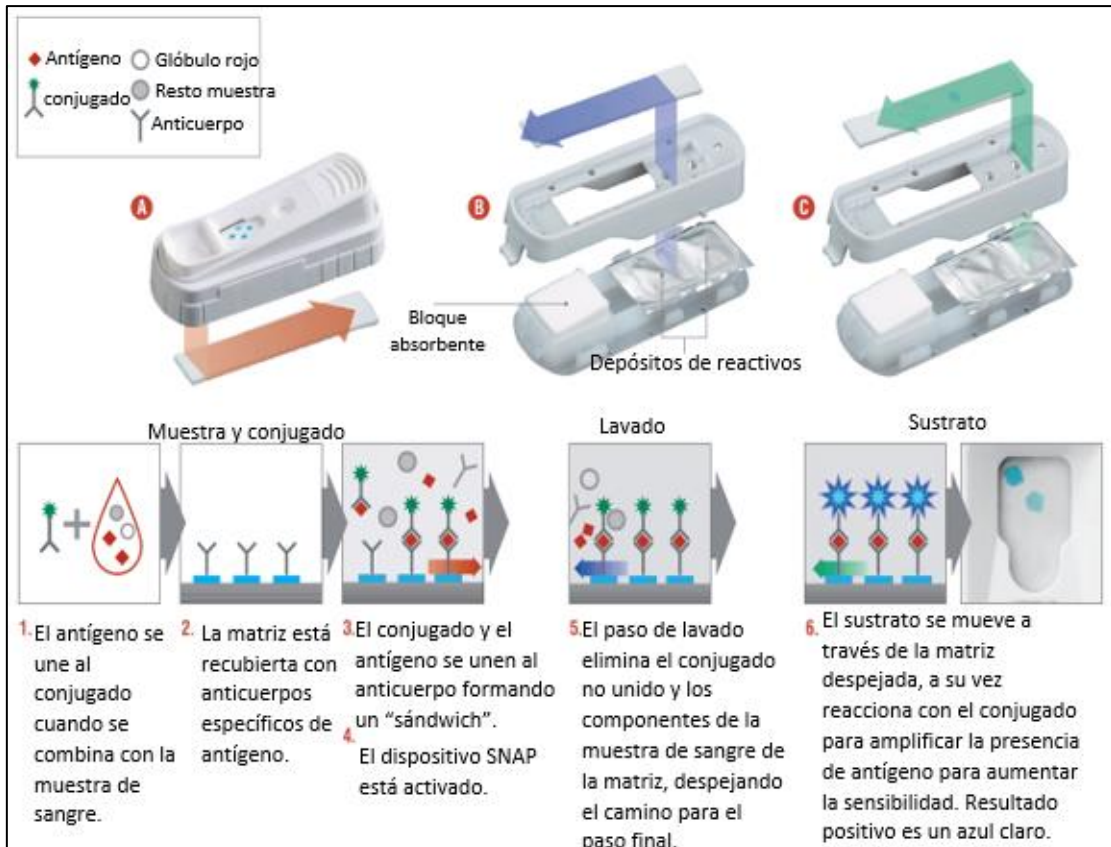


Figura 13. Mecanismo detallado del dispositivo SNAP. Se muestra el mecanismo de reacción para un ensayo de detección de antígeno usando anticuerpo inmovilizado y un conjugado anticuerpo-HRPO. Un ensayo de detección de anticuerpos sería similar, pero usaría antígeno inmovilizado y un conjugado antígeno-HRPO (O'Connor, 2015).

3.6.2 Fundamento del ensayo SNAP

El fundamento del ensayo de la tecnología SNAP fue descrito por O'Connor (2015), el cual se detalla a continuación:

Reacción inicial de antígeno o anticuerpo conjugado

El conjugado es un anticuerpo o antígeno unido covalentemente a la enzima peroxidasa de rábano (HRPO). El reactivo conjugado se mezcla con la muestra en un tubo de muestra antes de aplicarlo al dispositivo SNAP (Figura 13.1). El reactivo conjugado reacciona específicamente con el analito diana en la muestra (si está presente) y forma un complejo antígeno-anticuerpo marcado con HRPO.

Matriz de flujo y flujo de muestra

La matriz de flujo es un material de polietileno poroso blanco brillante, que es la pieza central del dispositivo SNAP. Operativamente, la muestra, el reactivo conjugado, el tampón de lavado y la

solución del sustrato fluyen a través de la matriz de polietileno. Los reactivos inmovilizados se aplican a la matriz en áreas separadas como puntos de prueba y control en un patrón que permite que las reacciones ocurran de manera independiente en una forma específica del reactivo (Figura 13.2). La mezcla de reactivo conjugado de muestra aplicada al pozo de muestra fluye a través de la matriz y llega a los puntos de prueba (Figura 13.A). Los complejos antígeno-anticuerpo marcados con HRPO (si están presentes) se unen al antígeno o reactivos de anticuerpos depositados en estos puntos para formar complejos inmunes (Figura 13.3).

Activación del dispositivo y flujo bidireccional

El dispositivo SNAP se activa manualmente cuando el flujo de la mezcla de muestra y conjugado alcanza el círculo de activación. La activación del dispositivo SNAP inicia pasos adicionales en el procedimiento ELISA como se describe a continuación: (1) Se perforan depósitos de solución de sustrato y tampón de lavado separados; se absorben y entran en contacto con la matriz y dirigen el flujo de tampón de lavado y solución de sustrato a la matriz. (2) El extremo del pozo de la muestra de la matriz se fuerza a entrar en contacto con un bloque absorbente que absorbe el líquido e invierte el flujo de líquido a través de la matriz.

La activación del dispositivo SNAP inicia el proceso de flujo inverso: el flujo de tampón de lavado (Figura 13.B) y solución de sustrato (Figura 13.C) desde los depósitos de reactivo a través de la matriz hasta el bloque absorbente en la dirección opuesta al flujo inicial de muestra y reactivo conjugado.

Paso de lavado

El tampón de lavado es una solución que contiene detergente, proteína inespecífica y conservantes. El tampón de lavado elimina los residuos no unidos y el reactivo conjugado sin reaccionar de la matriz y produce un fondo limpio y sin manchas para que los resultados se puedan interpretar fácilmente (Figura. 13.5).

Paso de sustrato

La solución de sustrato utilizada en el ensayo SNAP contiene TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina). Esta es una solución de sustrato que precipita: tras la reacción mediada por la enzima HRPO, el sustrato se vuelve de un color azul claro y se vuelve insoluble. Esto significa y marca la ubicación de los resultados positivos (Figura 13.6). La Figura 13 ilustra este procedimiento anteriormente mencionado (O'Connor, 2015).

3.6.3 Procedimiento del ensayo SNAP 4Dx plus (IDEXX).

Esta prueba comercial utiliza la tecnología SNAP para detectar el antígeno de *Dirofilaria immitis*, y anticuerpos frente a; *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia ewingii* en muestras de plasma, suero o sangre total de perros (IDEXX-Laboratories., 2020).

Cuadro 5. Sensibilidad y especificidad de la prueba SNAP 4Dx Plus (IDEXX-Laboratories., 2020).

	Sensibilidad (%) (I.C. 95%)	Especificidad (%) (I.C. 95%)
Antígeno <i>Dirofilaria immitis</i>	99.0% (94.3%–99.9%)	99.3% (97.4%–99.9%)
Anticuerpo <i>Anaplasma</i> sp.	90.3% (85.8%–93.7%)	94.3% (90.7%–96.7%)
Anticuerpo <i>Ehrlichia</i> sp.	97.1% (94.0%–98.8%)	95.3% (92.7%–97.2%)
Anticuerpo <i>Borrelia burgdorferi</i>	94.1% (88.3%–97.6%)	96.2% (92.9%–98.3%)

3.7 Diagnóstico de las muestras

Para ello, cada muestra, así como también los componentes del kit que estuvieron en refrigeración, se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) antes de iniciar la prueba (según instrucciones del fabricante) (IDEXX-Laboratories., 2020), luego se tomó 3 gota de suero, plasma o sangre total anticoagulada con la pipeta del kit y se vertió en un tubo de ensayo nuevo, se añadió 4 gotas de conjugado al tubo de ensayo sosteniéndolo en posición vertical, luego se tapó el tubo de ensayo y se mezcló invirtiéndolo firmemente de 3 a 5 veces. Seguido a esto se colocó en el dispositivo SNAP sobre una superficie horizontal y se añadió todo el contenido del tubo de ensayo. La muestra fluirá por la ventana de resultados, llegando al círculo de activación en 60 segundos aproximadamente, luego presionar el activador con firmeza hasta que quede al ras con el cuerpo del dispositivo. Leer el resultado después de 8 minutos de realizar este procedimiento. Seguir los pasos de la Figura 14.

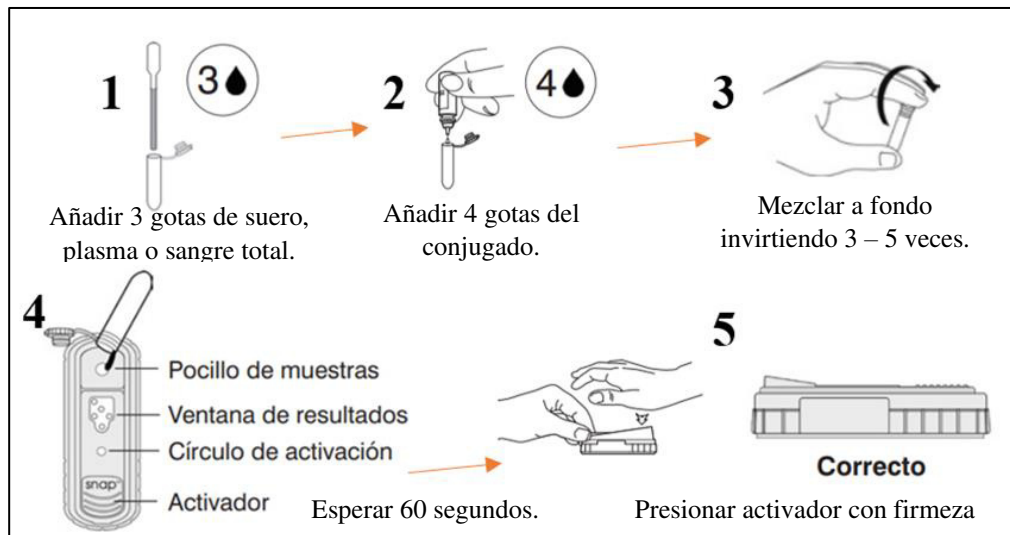


Figura 14. Procedimiento de análisis de SNAP 4Dx plus (IDEXX-Laboratories., 2020).

3.8 Interpretación de resultados

El SNAP 4Dx plus es una prueba serológica de tipo cualitativa, la cual solamente detecta la presencia de anticuerpos (Greene, 2012; Nelson y Couto, 2014; O'Connor, 2015). El desarrollo de color en el control positivo indica que los reactivos del ensayo son funcionales, puede ocurrir que el punto de control positivo desarrolle antes el color, sin embargo, la prueba no se habrá completado hasta que no pasen los 8 minutos (IDEXX-Laboratories., 2020).

Resultado positivo

La coloración azul claro en los puntos de la muestra cómo se observa en la Figura 15, nos indica que la muestra presenta antígeno de *Dirofilaria immitis*, anticuerpos frente a: *A. phagocytophilum* o *A. platys*, *B. burgdorferi*, *E. canis* o *E. ewingii*. Sin embargo, los resultados que indican anticuerpos para *A. phagocytophilum/A. platys*, así como para *E. canis/E. ewingii* no nos brinda información para diferenciar sobre cual agente en específico es el causante de la presentación de anticuerpos (IDEXX-Laboratories., 2020).

Cualquier desarrollo o intensidad de color en los puntos de la muestra indica la presencia de antígeno de *Dirofilaria immitis*, anticuerpos frente a: *A. phagocytophilum* o *A. platys*, *B. burgdorferi*, *E. canis* o *E. ewingii* (IDEXX-Laboratories., 2020).

Resultado negativo

Se expresa de tal manera que solamente se produce color en el punto de control positivo, como se observa en la figura 15.B (IDEXX-Laboratories., 2020).

Resultados inválidos

Existe la posibilidad de observar color de fondo si se permite que la muestra sobrepase el círculo de activación, sin embargo, si el color de fondo dificulta el resultado del análisis, se debe repetir la prueba. Por otra parte, si el punto de control positivo no produce color, se debe repetir la prueba (IDEXX-Laboratories., 2020).

Desde el punto de vista clínico los resultados de la prueba SNAP 4Dx expresa presencia o ausencia de anticuerpos y/o antígenos, un resultado positivo debe interpretarse como una infección actual o exposición previa a los patógenos en evaluación, se deben tomar en cuenta la historia clínica, examen clínico, alteraciones hematológicas y bioquímicas entre otros para aseverar una infección presente que nos permitirá realizar un tratamiento (Movilla *et al.*, 2016).

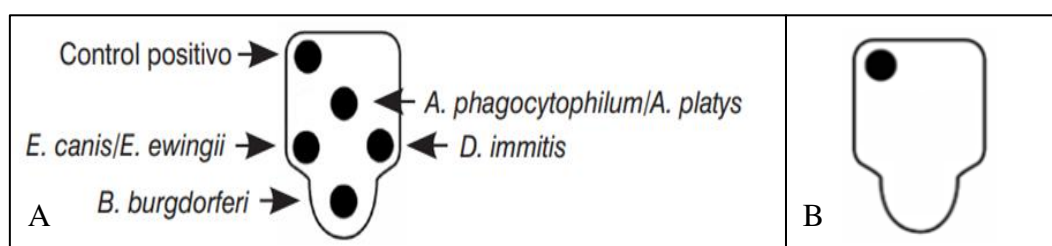


Figura 15. (A) Resultado positivo y (B) resultado negativo a la prueba SNAP 4Dx plus (IDEXX-Laboratories., 2020).

3.9 Análisis de Datos

Se determinó las prevalencias de las enfermedades transmitidas por vectores mediante tablas de frecuencia. Así mismo, se utilizó la prueba estadística de Chi cuadrado, Regresión Logística simple y múltiple para determinar la existencia de asociación estadística entre las variables: sexo (macho y hembra), edad (menores a 1 año, desde 1 año hasta menores de 2 años, desde 2 años hasta menores de 3 años, desde 3 años hasta menores de 4 años y desde 4 años a más edad), procedencia (Garbanzal, Rica Playa y Puerto Pizarro), lugar de crianza (crianza : dentro de sus casas, en la calle y una crianza mixta), raza (mestizo y no mestizo), evidencia de garrapatas (presencia y ausencia) y pelaje (corto, largo y sin pelo), respecto a la presencia de anticuerpos de *E. canis/E. ewingii*, *A. phagocytophilum/A. platys* y antígeno de *Dirofilaria immitis*. No se tomó en cuenta en el análisis la borreliosis canina debido a que no se encontró ningún caso positivo en el estudio. Se consideró un valor de $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo. Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico STATA v14.

Aspectos éticos

El presente estudio fue aprobado por el comité de ética y bien estar animal (CEBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con número de registro CEBA-2019-011 (Anexo 3).

IV. Resultados

Se obtuvieron un total de 169 muestras de perros, 59 (34.9 %) pertenecientes a Garbanzal, 59 (34.9 %) a Puerto Pizarro y 51 (30.2 %) a Rica Playa. De los animales muestreados 104 (61.5%) fueron machos y 65 (38.5%) hembras. Los perros muestreados se clasificaron por edades obteniéndose 23 (13.6 %) menores a 1 año, 39 (23.1 %) desde 1 año hasta menores de 2 años, 38 (22.5 %) desde 2 años hasta menores de 3 años, 18 (10.6 %) desde 3 años hasta menores de 4 años y 51 (30.2 %) desde 4 años a más edad. Se obtuvo datos del lugar de crianza, 49 (29.0 %) perros los criaban solo dentro de sus casas, 56 (33.1 %) solo en la calle y 64 (37.9%) tenían una crianza mixta (acceso libre a la casa y a la calle). Además, se obtuvo que 153 (90.5 %) perros era de raza mestiza y solo 16 (9.5 %) eran de otras razas. En la toma de muestra se evidencio la presencia de garrapatas en 134 (79.3 %) perros, pero 35 (20.7 %) estaban libres de estos parásitos. También se clasifico a los perros por el largo del pelaje obteniéndose que 129 (76.3 %) eran de pelaje corto, 37 (21.8 %) eran de pelaje largo y 3 (1.7 %) eran perros sin pelo (Cuadro 6).



Figura 16. Resultados del SNAP 4Dx plus en muestras de perros provenientes de zonas rurales de Tumbes. Muestras 114 y 115 son positivas a *E. canis*/*E. ewingii*, *A. phagocytophilum*/*A. platys* y *D. immitis*. Muestras 116 es positiva a *E. canis*/*E. ewingii* y *D. immitis*. Muestra 117 es negativa. Muestra 118 y 119 son positivas a *D. immitis*. Muestra 120 es positiva a *A. phagocytophilum*/*A. platys* y *D. immitis*.

Cuadro 6. Características de perros muestreados de zonas rurales de Tumbes (N=169).

Características	N (%)
Sexo	
Hembra	65 (38.5)
Macho	104 (61.5)
Edad (años)	
<1	23 (13.6)
1 ≤ - < 2	39 (23.1)
2 ≤ - < 3	38 (22.5)
3 ≤ - < 4	18 (10.6)
4 ≤	51 (30.2)
Procedencia	
Garbanzal	59 (34.9)
Rica playa	51 (30.2)
Puerto Pizarro	59 (34.9)
Lugar de crianza	
Solo casa	49 (29.0)
Solo calle	56 (33.1)
Mixto	64 (37.9)
Raza	
No mestizo	16 (9.5)
Mestizo	153 (90.5)
Evidencia de garrapatas	
Presencia	134 (79.3)
Ausencia	35 (20.7)
Pelaje	
Corto	129 (76.3)
Largo	37 (21.8)
Sin pelo	3 (1.7)

Prevalencia de las enfermedades transmitidas por vectores

Se obtuvo que el 83.4% (141/169) de muestras fueron positivos al menos a una enfermedad transmitida por vectores en las zonas rurales de Tumbes mediante la prueba SNAP 4Dx plus tal como se muestran los resultados en la Figura 16; además se obtuvo una prevalencia de 77.5 % (131/169) con un IC 95% de 70.5% - 83.6% de anticuerpos frente a *E. canis*/*E. ewingii*, 37.9 % (64/169) con un IC 95% de 30.5% - 45.6% de anticuerpos frente a *A. phagocytophilum*/*A. platys* y 26.0 % (44/169) con un IC 95% de 19.6% - 33.3% de antígeno de *Dirofilaria immitis* (Cuadro 7).

Cuadro 7. Prevalencia de enfermedades transmitidas por vectores en perros de zonas rurales de Tumbes (N=169).

Agente	Positivos (n)	Prevalencia (%)	IC 95% (%)
<i>A. phagocytophilum/A. platys</i>	64	37.9	30.5 - 45.6
<i>E. canis/E. ewingii</i>	131	77.5	70.5 - 83.6
<i>D. immitis</i>	44	26	19.6 - 33.3

IC: Intervalo de confianza

Se obtuvieron muestras positivas a dos agentes como: 36.1% (61/169) con un IC 95% de 28.8% – 43.8% para *A. phagocytophilum/A. platys* y *E. canis/E. ewingii*, 10.6 % (18/169) con un IC 95% de 6.4% - 16.3% para *Dirofilaria immitis* y *A. phagocytophilum/A. platys*, 20.7 % (35/169) con un IC 95% de 14.8% – 27.6% para *E. canis/E. ewingii* y *Dirofilaria immitis*, así como también se registró que 9.5% (16/169) con un IC 95% de 5.5% - 14.9% perros resultaron ser positivos para *A. phagocytophilum/A. platys*, *E. canis/E. ewingii* y *D. immitis* (Cuadro 8).

Cuadro 8. Seropositividad múltiple a la prueba Snap 4Dx en perros de zonas rurales de Tumbes (N=169).

Agente	Positivos (n)	Prevalencia (%)	IC 95% (%)
<i>A. phagocytophilum/A. platys</i> <i>E. canis/E. ewingii</i>	61	36.1	28.8 – 43.8
<i>Dirofilaria immitis</i> <i>A. phagocytophilum/A. platys</i>	18	10.6	6.4 – 16.3
<i>E. canis/E. ewingii</i> <i>Dirofilaria immitis</i>	35	20.7	14.8 – 27.6
<i>A. phagocytophilum/A. platys</i> <i>E. canis/E. ewingii</i> <i>D. immitis</i>	16	9.5	5.5 - 14.9

IC: Intervalo de confianza

Asociación estadística entre las variables de estudio

Mediante la prueba de Chi cuadrado se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia de anticuerpos de *E. canis*/*E. ewingii* con edad ($p = 0.002$), lugar de crianza ($p = 0.003$) y raza ($p = 0.002$) (Cuadro 9) y la presencia de antígenos de *Dirofilaria immitis* con edad ($p = 0.001$), procedencia ($p < 0.001$) y lugar de crianza ($p = 0.001$) (Cuadro 11). Además, no se encontró asociación estadística entre la presencia de anticuerpos de *A. phagocytophilum*/*A. platys* con ninguna de las variables analizadas (Cuadro 10).

Cuadro 9. Factores asociados con la presencia de anticuerpos de *E. canis*/*E. ewingii* en análisis bivariado.

Variables	<i>E. canis</i> / <i>E. ewingii</i>		p*
	Presencia (N=131) N(%)	Ausencia (N=38) N(%)	
Sexo			0.366
Hembra	48 (73.8)	17 (26.2)	
Macho	83 (79.8)	21 (20.2)	
Edad			0.002
<1	13 (56.5)	10 (43.5)	
$1 \leq - < 2$	25 (64.1)	14 (35.9)	
$2 \leq - < 3$	31 (81.6)	7 (18.4)	
$3 \leq - < 4$	17 (94.4)	1 (5.6)	
$4 \leq$	45 (88.2)	6 (11.8)	
Procedencia			0.177
Garbanzal	49 (83.1)	10 (16.9)	
Rica playa	41 (80.4)	10 (19.6)	
Puerto Pizarro	41 (69.5)	18 (30.5)	
Lugar de crianza			0.003
Solo casa	31 (63.3)	18 (36.7)	
Solo calle	51 (91.1)	5 (8.9)	
Mixto	49 (76.6)	15 (23.4)	
Raza			0.032
No Mestizo	9 (56.3)	7 (43.7)	
Mestizo	122 (79.7)	31 (20.3)	
Evidencia de garrapatas			0.155
Presencia	107 (79.8)	27 (20.2)	
Ausencia	24 (68.6)	11 (31.4)	
Pelaje			0.181
Corto	101 (78.3)	28 (21.7)	
Largo	29 (78.4)	8 (21.6)	
Sin pelo	1 (33.3)	2 (66.7)	

*Se consideró un valor significativo de $p \leq 0.05$

Cuadro 10. Factores asociados con la presencia de anticuerpos de *A. phagocytophilum*/*A. platys* en análisis bivariado.

Variables	<i>A. phagocytophilum</i> / <i>A. platys</i>		p*
	Presencia (N=64) N(%)	Ausencia (N=105) N(%)	
Sexo			0.9
Hembra	25 (38.5)	40 (61.5)	
Macho	39 (37.5)	65 (62.5)	
Edad			0.638
<1	7 (30.4)	16 (69.6)	
1 ≤ - < 2	13 (33.3)	26 (66.7)	
2 ≤ - < 3	18 (47.4)	20 (52.6)	
3 ≤ - < 4	6 (33.3)	12 (66.7)	
4 ≤	20 (39.2)	31 (60.8)	
Procedencia			0.618
Garbanzal	25 (42.4)	34 (57.6)	
Rica playa	17 (33.3)	34 (66.7)	
Puerto Pizarro	22 (37.3)	37 (62.7)	
Lugar de crianza			0.145
Solo casa	13 (26.5)	36 (73.5)	
Solo calle	23 (41.1)	33 (58.9)	
Mixto	28 (43.8)	36 (56.2)	
Raza			0.098
No Mestizo	3 (18.7)	13 (81.3)	
Mestizo	61 (39.9)	92 (60.1)	
Evidencia de garrapatas			0.623
Presencia	52 (38.8)	82 (61.2)	
Ausencia	12 (34.3)	23 (65.7)	
Pelaje			0.316
Corto	48 (37.2)	81 (62.8)	
Largo	16 (43.2)	21 (56.8)	
Sin pelo	0 (0)	3 (100)	

*Se consideró un valor significativo de $p \leq 0.05$

Cuadro 11. Factores asociados con la presencia de antígeno de *Dirofilaria immitis* en análisis bivariado.

Variables	<i>Dirofilaria immitis</i>		p*
	Presencia (N=44) N(%)	Ausencia (N=125) N(%)	
Sexo			0.268
Hembra	20 (30.8)	45 (69.2)	
Macho	24 (23.1)	80 (76.9)	
Edad			0.001
<1	0 (0)	23 (100)	
1 ≤ - < 2	8 (20.5)	31 (79.5)	
2 ≤ - < 3	15 (39.5)	23 (60.5)	
3 ≤ - < 4	2 (11.1)	16 (88.9)	
4 ≤	19 (37.3)	32 (62.7)	
Procedencia			<0.001
Garbanzal	7 (11.9)	52 (88.1)	
Rica playa	2 (3.9)	49 (96.1)	
Puerto Pizarro	35 (59.3)	24 (40.7)	
Lugar de crianza			0.001
Solo casa	11 (22.5)	38 (77.5)	
Solo calle	24 (42.9)	32 (57.1)	
Mixto	9 (14.1)	55 (85.9)	
Raza			0.195
No Mestizo	2 (12.5)	14 (87.5)	
Mestizo	42 (27.4)	111 (72.6)	
Evidencia de garrapatas			0.961
Presencia	35 (26.1)	99 (73.9)	
Ausencia	9 (25.7)	26 (74.3)	
Pelaje			0.566
Corto	31 (24.0)	98 (25.7)	
Largo	12 (32.43)	25 (67.6)	
Sin pelo	1 (33.3)	2 (66.7)	

*Se consideró un valor significativo de $p \leq 0.05$

En el análisis de regresión logística simple (Cuadro 12) se encontró que la chance de presentar anticuerpos de *E. canis/E. ewingii* en perros con dos o más años y menores a tres; tres o más años y menores a cuatro; y con cuatro años o más es 3.41 , 13.08 y 5.77 veces la chance de presentar anticuerpos de *E. canis/E. ewingii* en perros menores a un año (IC 95%: 1.06 - 10.90; $p=0.039$), (IC 95%: 1.48 - 115.54; $p=0.021$) y (IC 95%: 1.76 - 18.88; $p=0.004$), respectivamente. Además, la chance de presentar anticuerpos de *E. canis/E. ewingii* en perros que son mestizos es 3.06 veces la chance de presentar anticuerpos de *E. canis/E. ewingii* en perros no mestizos (IC 95%: 1.06 –

8.87; $p=0.039$) y que la chance de presentar anticuerpos de *E. canis/E. ewingii* en perros que son criados en la calle es 5.92 veces la chance de presentar anticuerpos de *E. canis/E. ewingii* en perros que solo se crían en casa (IC 95%: 2.00 - 17.56; $p=0.001$).

También, se encontró que la chance de presentar antígenos de *Dirofilaria immitis* en perros que son criados en la calle es 2.59 veces la chance de presentar antígenos de *D. immitis* en perros que solo se crían en casa (IC 95%: 1.10 - 6.09; $p=0.029$) y que la chance de presentar antígenos de *Dirofilaria immitis* en perros con procedencia de Puerto Pizarro es 10.8 veces la chance para presentar antígenos de *D. immitis* en perros con procedencia de Garbanzal (IC 95%: 4.21 - 27.86; $p<0.001$).

Cuadro 12. Factores independientemente asociados a *E. canis*/*E. ewingii*, *A. phagocytophilum*/*A. platys* y *Dirofilaria immitis* en análisis de regresión logística simple.

Variables		<i>A. phagocytophilum</i> / <i>A. platys</i>			<i>E. canis</i> / <i>E. ewingii</i>			<i>Dirofilaria immitis</i>		
		OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p
Sexo										
	Hembra	Ref.			Ref.			Ref.		
	Macho	0.96	0.51 - 1.82	0.900	1.40	0.67 - 2.91	0.368	0.675	0.34 - 1.35	0.269
Edad (años)										
	<1	Ref.			Ref.			-		
	1 ≤ - < 2	1.14	0.38 - 3.47	0.814	1.37	0.48 - 3.94	0.554	Ref.		
	2 ≤ - < 3	2.06	0.69 - 6.14	0.196	3.41	1.06 - 10.90	0.039	2.53	0.92 - 6.96	0.073
	3 ≤ - < 4	1.14	0.30 - 4.29	0.843	13.08	1.48 - 115.54	0.021	0.48	0.09 - 2.55	0.393
	4 ≤	1.47	0.52 - 4.22	0.469	5.77	1.76 - 18.88	0.004	2.30	0.88 - 6.02	0.090
Procedencia										
	Garbanzal	Ref.			Ref.			Ref.		
	Puerto Pizarro	0.81	0.39 - 1.69	0.573	0.46	0.19 - 1.12	0.087	10.8	4.21 - 27.86	<0.001
	Rica playa	0.68	0.31 - 1.48	0.331	0.84	0.32 - 2.21	0.719	0.30	0.06 - 1.53	0.149
Lugar de crianza										
	Solo casa	Ref.			Ref.			Ref.		
	Solo calle	1.93	0.84 - 4.42	0.120	5.92	2.00 - 17.56	0.001	2.59	1.10 - 6.09	0.029
	Mixto	2.15	0.96 - 4.81	0.061	1.90	0.84 - 4.31	0.126	0.57	0.21 - 1.50	0.251
Raza										
	No mestizo	Ref.			Ref.			Ref.		
	Mestizo	2.87	0.79 - 10.50	0.111	3.06	1.06 - 8.87	0.039	2.65	0.58 - 12.15	0.210
Evidencia de garrapatas										
	Ausencia	Ref.			Ref.			Ref.		
	Presencia	1.22	0.56 - 2.65	0.624	1.82	0.79 - 4.16	0.158	1.02	0.44 - 2.39	0.961
Pelaje										
	Corto	Ref.			Ref.			Ref.		
	Largo	1.29	0.61 - 2.70	0.507	1.00	0.41 - 2.44	0.991	1.52	0.68 - 3.37	0.306
	Sin pelo	-			0.14	0.01 - 1.59	0.112	1.58	0.14 - 18.03	0.712

IC: Intervalo de confianza; OR: odds ratio; Se consideró un valor significativo de $p \leq 0.05$

En el análisis de regresión logística múltiple (Cuadro 13), se encontró que la chance de presentar anticuerpos de *E. canis/E. ewingii* en perros que son criados en la calle es 6.54 veces la chance de presentar anticuerpos de *E. canis/E. ewingii* en perros que solo se crían en casa (IC 95%: 2.06 - 20.75; p=0.001), ajustado por edad. Además, se encontró que la chance de presentar antígenos de *Dirofilaria immitis* en perros con procedencia de Puerto Pizarro es 10.4 veces la chance para presentar antígenos de *D. immitis* en perros con procedencia de Garbanzal (IC 95%: 3.92 - 27.55; p<0.001) ajustado por lugar de crianza.

Cuadro 13. Factores asociados a *E. canis/E. ewingii* y *Dirofilaria immitis* en análisis de regresión logística múltiple.

Variables	<i>E. canis/E. ewingii</i>			<i>Dirofilaria immitis</i>		
	OR*	IC 95%	p	OR [†]	IC 95%	p
Edad (años)						
<1	Ref.					
1 ≤ - < 2	0.98	0.31 - 3.01	0.973			
2 ≤ - < 3	3.14	0.93 - 10.58	0.065			
3 ≤ - < 4	11.9	1.30 - 108.29	0.028			
4 ≤	4.87	1.43 - 16.55	0.011			
Procedencia						
Garbanzal				Ref.		
Puerto Pizarro				10.4	3.92 - 27.55	<0.001
Rica playa				0.33	0.06 - 1.73	0.191
Lugar de crianza						
Solo casa	Ref.			Ref.		
Solo calle	6.54	2.06 - 20.75	0.001	1.33	0.48 - 3.69	0.579
Mixto	1.83	0.75 - 4.43	0.179	1.06	0.32 - 3.43	0.918

*Ajustado por edad

[†]Ajustado por lugar de crianza

V. Discusión

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) en perros se encuentran distribuidas a nivel mundial, estas enfermedades están presentes en gran medida en regiones donde se encuentren factores medioambientales que son de carácter propicio para el desarrollo de vectores transmisores y donde presenten antecedentes epidemiológicos de la presencia de la enfermedad (Maggi y Kramer, 2019).

Los resultados en este trabajo de investigación indican que Tumbes es una zona endémica para ehrlichiosis, anaplasmosis y dirofilariasis canina. La infección por *E. canis*/*E. ewingii* fue la ETV más frecuente en perros, con una prevalencia de 77.5% (131/169) con un IC 95% (70.5 - 83.6). Estos resultados se ven reflejados con la infestación por garrapatas encontradas en los perros, el 79.3% (134/169) de ellos presentaba al menos una garrapata en el cuerpo. Como se sabe, las garrapatas Ixodidae son vectores de varias especies de *Ehrlichia* en los perros (Bowman y Patricia, 2008). Por lo tanto, la presencia del vector en los animales indica el gran problema sanitario que presentan los perros de estos distritos. Como se ha mencionado antes, los lugares donde se realizó el estudio corresponden a zonas rurales.

En estos lugares los dueños de los animales no llevan a sus mascotas a clínicas veterinarias y los animales no reciben ningún tratamiento de desparasitación externa e interna. Además, debido a las condiciones rurales, los perros presentan diferentes tipos de crianza en la cual el 29% (49/169) se crían solamente en casa, el 33.1% (56/169) se crían solamente en la calle, y el 37.9% (64/169) se crían libres con acceso tanto en sus viviendas y la calle (mixto). En este tipo de crianza no controlado los perros están en contacto frecuente con perros callejeros o vagabundos (sin dueño) que son portadores de garrapatas (Nuntón *et al.*, 2013), actuando como

reservorio para enfermedades infecciosas. Se puede decir que la mayoría de los dueños desconoce de la existencia de esta enfermedad que muchas veces se puede presentar subclínicamente, pasando desapercibida por ellos.

Respecto a la prevalencia de la ehrlichiosis canina, los resultados de este estudio fueron similares a un estudio realizado en Tumbes, en donde se utilizó perros de casa pertenecientes al caserío de “pechichal” donde se encontró una prevalencia de 67.3 % de anticuerpos contra *E. canis* mediante ensayo inmunocromatográfico de una muestra total de 52 perros (Pinedo, 2018). Asimismo, otro estudio realizado en el norte del Perú, en Piura, se halló una prevalencia de 40.7% en 81 perros de casa del distrito de Castilla, para el diagnóstico se detectó anticuerpos contra *E. canis* utilizando una prueba rápida ELISA indirecta (Zapata, 2014). Estos trabajos fueron realizados en lugares con características medioambientales muy semejantes a los de Tumbes, los que involucran terreno, temperatura y humedad, favoreciendo al hábitat de las garrapatas (Dantas-Torres, 2008; Sonenshine y Roe, 2014), como se revela en el trabajo en la región de Chiclayo de Cervantes (2020), en Tumbes Nuntón (2013) y en Trujillo Huamán y Jara (2017) donde sus hallazgos evidencian la marcada presencia de garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus*.

En este estudio al evaluar la relación entre la edad de los perros muestreados categorizados por grupos y la presencia de anticuerpos contra *E. canis/E. ewingii*, se determinó que los perros con dos o más años y menores a tres; tres o más años y menores a cuatro; y con cuatro años o más tienen un OR de 3.41 ($p=0.039$), OR de 13.08 ($p=0.021$), OR de 5.77 ($p=0.004$) respectivamente, en comparación a los perros menores a un año de tener anticuerpos para *E. canis/E. ewingii*.

En el presente estudio se determinó la relación entre el lugar de crianza y la presencia de anticuerpos contra *E. canis/E. ewingii*, determinándose que los perros criados en la calle tienen un OR de 5.92 ($p=0.001$), en comparación a los perros que solo se crían en casa de tener anticuerpos para *E. canis/E. ewingii*., así mismo, después de ajustar por edad, la crianza solo en la calle sigue siendo significativa con un OR de 6.54 ($p=0.001$), Esta relación puede deberse a que cuando un animal permanece más tiempo en la calle, está en contacto con perros vagabundos los cuales presentan una frecuencia de 92.5% presencia de garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* (Nuntón *et al.*, 2013), lo que conlleva a mayor posibilidad de infectarse de ehrlichiosis.

Nuestro trabajo evaluó la relación entre la raza y la presencia de anticuerpos contra *E. canis*/*E. ewingii*, se determinó que los perros mestizos tienen un OR de 3.06 ($p=0.039$) en comparación a los perros que no son mestizos de tener anticuerpos para *E. canis*/*E. ewingii*. Sin embargo, esto se debe a que el 90.5 % del total de perros muestreados fueron mestizos.

Por otro lado, otros estudios han sido desarrollados en diversas regiones del Perú. Un estudio realizado en la ciudad de Huánuco, se encontró una seroprevalencia de 51.3% para *E. canis* en 150 perros con garrapatas provenientes de 10 consultorios veterinarios, la técnica de diagnóstica usada fue la prueba de inmunoensayo cromatográfico (Huerto-Medina y Damaso-Mata, 2015). En Piura, un trabajo donde se seleccionó perros con garrapatas y con signos compatibles con ehrlichiosis y/o anaplasmosis que llegaban a consulta en una clínica veterinaria, determinó la frecuencia de la enfermedad mediante una prueba comercial ELISA y se encontró que el 55 % de las 71 muestras presentaba anticuerpos para *Ehrlichia* spp. (Naranjo, 2018). Estas prevalencias obtenidas son menores comparadas con la del presente estudio, esta diferencia puede deberse que los perros eran pacientes de clínicas veterinarias, lo que indicaría un mejor cuidado del animal por parte de los dueños.

En la ciudad de Chimbote, un estudio determinó la frecuencia de anticuerpos contra *E. canis* mediante una prueba comercial inmunocromatográfica encontró una prevalencia de 23.3 % en 30 perros muestreados de diferentes clínicas veterinarias de esa ciudad (Jara, 2014). Aunque en este estudio la prevalencia fue menor a la nuestra, esto podría deberse al número de muestra empleado, el cual fue reducido. Por otro lado, en la ciudad de Trujillo se obtuvo una prevalencia de 37 %, mediante la prueba del frotis sanguíneo en perros con antecedentes de garrapatas en los últimos 3 meses (Rabanal, 2014). En la ciudad de Tacna, también se obtuvo una prevalencia 37.78 % mediante el uso de una prueba de ELISA comercial (Quenta, 2013). Estas prevalencias son menores a la del presente estudio, se debe tener en cuenta la baja sensibilidad de la prueba de frotis sanguíneo realizada en el estudio de Trujillo, así como también las diferencias en el control sanitario de los perros muestreados.

En Iquitos, se evaluó serológicamente la ocurrencia de *Ehrlichia* spp. en 30 perros con trombocitopenia. Los resultados indicaron 18 animales positivos a la prueba, lo que indico una prevalencia del 60 % (Villaverde, 2017). Estos resultados son muy similares a nuestro trabajo; sin embargo, cabe mencionar que el estudio se realizó con animales clínicamente enfermos, con signos clínicos compatibles con ehrlichiosis canina.

Un estudio realizado en tres distritos de Lima: Chorrillos, San Juan de Miraflores y la Molina, con una muestra total de 140 perros y usando una prueba comercial ELISA, obtuvo una prevalencia de 16.5 % para anticuerpos contra *E. canis*. (Adrianzén *et al.*, 2003). Esta prevalencia es menor comparada a la del presente trabajo, sin embargo, este estudio fue el primero en reportar la presencia de anticuerpos de *E. canis* en el país. Por otro lado, en 77 perros atendidos en una clínica veterinaria de Lima, que presentaban signos clínicos compatibles con ehrlichiosis, se les evaluó hematológicamente y mediante la prueba ELISA indirecto, resultando en una prevalencia de 75.3% (Hoyos *et al.*, 2007). Este estudio obtuvo una prevalencia similar al presente trabajo utilizando la misma técnica de diagnóstico (SNAP); sin embargo, los animales incluidos en el estudio fueron clínicamente diagnosticados con ehrlichiosis.

Otro estudio que busca la frecuencia de *E. canis* en muestras de pacientes sospechosos de Lima Norte, analizó una base de datos de un laboratorio, encontrando una frecuencia 59.4 % para *E. canis* en 1216 análisis realizados (Zúñiga, 2018). Este estudio presenta una prevalencia menor comparada a nuestro estudio, sin embargo, aquí se empleó un número de muestra mayor a la de nuestro estudio, así como también se usó muestras de pacientes sospechosos.

En cuanto al diagnóstico molecular, un estudio analizó 30 muestras de perros con hemograma compatible con ehrlichiosis canina de Lima Norte mediante la técnica de PCR y logró detectar 43.3% de muestras positivas para *Ehrlichia* spp. (Vicente, 2017). Esta prevalencia es menor comparado a los del presente estudio, esto es debido al número de tamaño de muestra, así como también por la temporada de invierno en el cual se realizó el estudio que no es favorable para el ciclo biológico de la garrapata. Asimismo, es importante mencionar que la técnica de PCR detecta al patógeno en la muestra biológica (sangre), sin embargo, la técnica serológica detecta anticuerpos contra el patógeno. Por lo tanto, las pruebas serológicas identifican a animales expuestos a *Ehrlichia* spp. que no necesariamente estén infectados con el patógeno. Esto también podría indicar la baja prevalencia obtenida en el estudio de Vicente (2017) comparándolo con nuestros resultados.

Respecto a la ehrlichiosis canina en otros países del continente americano, en Venezuela, en el estado rural de Aragua se encontró una seroprevalencia de 77.3% en un total de 110 perros (Martínez *et al.*, 2015). Otro trabajo realizado en tres ciudades de Colombia: Medellín, Barranquilla y Cartagena nos muestran una prevalencia de 62% para anticuerpos contra *E. canis*. (McCown *et al.*, 2015). Ambos resultados son similares a los presentados en este estudio, se registró que el 68% de perros muestreados presentaban garrapatas en Aragua, esto podría deberse

al medioambiente que presentan estos lugares de estudio, el estado de Aragua presenta un clima cálido y por otro lado las ciudades mencionadas de Colombia presentan un clima tropical húmedo que son propicios para la presencia de vectores como garrapatas. Recientemente en el norte de Colombia, en las ciudades de Santa Marta y Ciénaga se detectó 15.3% de prevalencia para ehrlichiosis canina mediante diagnóstico molecular utilizando PCR (Pesapane *et al.*, 2019), como se mencionó anteriormente, la técnica de PCR detecta presencia del patógeno, quizás esa sea la razón de la baja prevalencia al no ser detectado los animales expuesto a *E. canis*.

Por otro lado, en Chile, la ciudad de Arica presento una prevalencia para ehrlichiosis canina de 16.5 % (Vicente, 2016). Asimismo, en la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas en Ecuador, se observó una prevalencia de 7% (Calvache, 2014) y en las islas Galápagos se encontró una prevalencia de 48.3% (Jiménez *et al.*, 2020), estos estudios fueron realizados en pacientes de clínicas veterinarias. Sin embargo, en un estudio realizado en la ciudad de Guayaquil, donde se buscó la enfermedad en perros callejeros, se obtuvo una prevalencia de 73% (Tutachá, 2016), dejando en evidencia la predisposición de los perros callejeros a la presentación de la enfermedad y a la vez considerarlos reservorio de esta enfermedad, este resultado es similar en comparación a nuestro estudio.

Recientemente en la ciudad de Asunción, Paraguay se determinó mediante el PCR convencional una prevalencia de 10.4 % para ehrlichiosis canina, además de demostrar que la ausencia de un protocolo de eliminación de las garrapatas es un factor de riesgo para la presentación de la enfermedad (Pérez-Macchi *et al.*, 2019). Asimismo, en México, un estudio realizado en 1706 perros de todo el país se determinó una seroprevalencia de 51 %, siendo la enfermedad transmitida por vectores en perros con más presencia en ese país (Movilla *et al.*, 2016). Como se observa, la ehrlichiosis canina es una enfermedad muy prevalente en diversos países del continente americano, indicando su distribución desde el hemisferio norte hacia el hemisferio sur, abarcando diferentes nichos ecológicos.

Con respecto a anaplasmosis canina, en el Perú existen reducidos estudios acerca de esta enfermedad, la mayoría de los trabajos de investigación en ETV en caninos se concentra en la ehrlichiosis. Sin embargo, es importante conocer la situación actual de esta enfermedad, debido a que es tomada en cuenta como un diagnóstico diferencial para la ehrlichiosis canina debido a la similitud en los signos clínicos. Nuestros resultados indican una infección de *A. phagocytophilum*/*A. platys* representando una prevalencia 37.9 % (64/169) con un IC 95% (30.5 - 45.6).

Estudios sobre anaplasmosis canina realizados en Lambayeque, determinan una seroprevalencia en el distrito de Chiclayo de 22.73% de *Anaplasma* spp. mediante la prueba SNAP 4Dx Plus (Álvarez, 2019), en el distrito de La Victoria 33.67% para *Anaplasma* spp. mediante la prueba SNAP 4Dx Plus (Paico, 2018), y de 55.1% para *Anaplasma* spp. para los distritos de José Leonardo Ortiz, La Victoria y Chiclayo, mediante el kit Vet Scan Anaplasma Rapid Test (Delgado y Montoya, 2018), estas prevalencias obtenidas en el mismo departamento evidencian la gran exposición de los perros de esta región. Estos resultados superiores al encontrado en nuestro trabajo, pueda deberse a que los estudios de Lambayeque se realizaron en perros con signos clínicos compatibles con la enfermedad, además de un historial previo de garrapatas. Asimismo, en un estudio realizado en Piura, donde se analizaron muestras de perros con antecedentes de garrapatas y signos compatibles de ehrlichiosis y anaplasmosis, se encontró una seroprevalencia de 4.2% (n=71) para *Anaplasma* spp. (Naranjo, 2018), con estos resultados, queda la evidencia de una alta prevalencia para la enfermedad en el norte del Perú, en las ciudades de Lambayeque y Tumbes.

Recientemente también en Chiclayo un estudio evidencio la presencia de estructuras compatibles con cuerpos de inclusión o mórulas de *Anaplasma phagocytophilum* observados mediante frotices de sangre periférica en 9% de 100 muestras de caballos con antecedentes de garrapatas (Masgo, 2018). Nuestro estudio juntos con los hallazgos mencionados anteriormente dejan en claro la presencia de anaplasma en la zona norte del Perú.

Los estudios sobre anaplasmosis canina en la ciudad de Lima son muy escasos. Un reporte indica la presencia de *A. platys* en 1.4% de perros con signos clínicos compatibles con anaplasmosis, el diagnóstico del patógenos fue realizado mediante la prueba molecular de PCR (Tateishi *et al.*, 2015). El trabajo de Tateishi *et al.* (2015) es el único que identifica la especie causante de la enfermedad. Por lo tanto, será necesario utilizar las técnicas moleculares en el diagnóstico de la anaplasmosis canina en la ciudad de Tumbes para determinar la especie involucrada en la enfermedad.

En el Ecuador, específicamente en las islas Galápagos, la anaplasmosis canina tuvo una prevalencia de 12.1% (Jiménez *et al.*, 2020), y en la ciudad de Guayaquil la prevalencia fue de 21 % (Tutachá, 2016), cabe mencionar que el último estudio fue realizado en perros callejeros. Asimismo, un trabajo realizado en Santo Domingo de los Tsáchilas encontró una prevalencia de 10 % de anticuerpos frente a *Anaplasma* spp. (Calvache, 2014), estos trabajos dejan en evidencia

que la prevalencia de esta infección en Ecuador es menor en comparación a nuestro estudio, a pesar de que Tumbes es una zona limítrofe con Ecuador.

En la ciudad de Asunción en Paraguay, se determinó mediante la técnica de PCR una prevalencia de 10.6 % en perros, además indico que la ausencia de tratamiento de las garrapatas es un factor de riesgo para presentar la enfermedad (Pérez-Macchi *et al.*, 2019). Este resultado es similar con las prevalencias reportadas en Ecuador, pero menor a la de nuestro estudio.

Así mismo, en cuatro regiones de Chile, se determinó la seroprevalencia de 44% para *A. phagocytophilum* en 905 perros (Acosta-Jamett *et al.*, 2020), la alta prevalencia de esta especie de anaplasma podría deberse a la presencia del vector del género *Ixodes* identificada como transmisor de *Anaplasma* spp. en este país (Muñoz-Leal *et al.*, 2019), esta prevalencia es mayor a la del presente estudio además de emplear un tamaño de muestra mayor. En México, un estudio realizado en perros de todo el país demostró una seroprevalencia de 16.4 % (Movilla *et al.*, 2016) esta prevalencia es menor a la presentada en nuestro estudio.

Un estudio anteriormente mencionado realizado en tres ciudades de Colombia: Medellín, Barranquilla y Cartagena, registro una prevalencia de 33% frente a anticuerpos contra *A. phagocytophilum* (McCown *et al.*, 2015), este resultado es similar a la de nuestro trabajo. Sin embargo, recientemente al norte de Colombia, en las ciudades de Santa Marta y Ciénaga, se detectó 20.2 % de prevalencia para *Anaplasma* spp. mediante pruebas moleculares (Pesapane *et al.*, 2019), dejando en evidencia una menor prevalencia al norte de este país.

En lo que respecta a *Dirofilaria immitis*, se encontró que la infección por este nematodo resulto en una prevalencia de 26 % (44/169) con un IC 95% (19.6 - 33.3). Este resultado es el más alto en comparación con otros estudios realizados en el país.

En el presente estudio al evaluar el lugar de crianza y la presencia de *D. immitis*, se demostró que existe relación significativa entre ambas variables, ya que los perros criados en la calle tienen un OR de 2.59 (p=0.029) en comparación a los perros que solo se crían en casa de tener antígenos de *D. immitis*.

Uno de los estudios realizados en Perú, fue ejecutado en Ayacucho, en el distrito de Santa Rosa - VRAEM, se observó una prevalencia de 2.4 % mediante el método Knott modificado (Carlos, 2019), la baja prevalencia puede deber a que Ayacucho está localizado en la sierra del

Perú y no tiene un ecosistema óptimo para el desarrollo de mosquitos vectores de la enfermedad, y por lo tanto la abundancia de ellos debe de ser muy mínima, lo que repercute en una baja exposición al parásito.

Asimismo, estudios se han realizado en diversos distritos de Lima, en perros de los distritos de Chorrillos, San Juan de Miraflores y la Molina, y obtuvo una prevalencia de 4.4 % para *D. immitis*. (Adrianzén *et al.*, 2003). Por otro lado, otro estudio realizado en los distritos de San Martín de Porres, Rímac y Cercado de Lima obtuvo una prevalencia similar al anterior de 4.7 % (Acuña y Chávez, 2002). Además, en los distritos de Ventanilla, Puente Piedra, Comas, Carabayllo y Los Olivos se encontró una prevalencia de 3 % (Chipana *et al.*, 2002). Finalmente, en un trabajo realizado en el distrito de San Juan de Lurigancho se logró detectar una prevalencia de 5.5% (Corimanya *et al.*, 2004). En todos estos trabajos el método de diagnóstico fue mediante la prueba comercial ELISA para la detección de antígenos de *D. immitis* al igual que nuestro estudio. Sin embargo, la baja prevalencia para *D. immitis* en los perros de Lima podría deberse a la crianza empleada, la cual en contraste con Tumbes, en Lima la mayoría de dueños mantiene a sus perros dentro de sus casas, por otro lado estos estudios realizados cerca del río Rímac ubicado en el distrito del Rímac y Pantanos de Villa en Chorrillos, se esperaría una alta prevalencia por presentar zonas con cuerpos de agua permanentes favorables para el desarrollo de mosquitos sin embargo no es así, esto confirma la necesidad de un clima cálido para el desarrollo de mosquitos como lo presenta Tumbes debido a su cercanía con la línea ecuatorial, ya es conocido que de Tumbes es una ciudad endémica para enfermedades transmitidas por mosquitos en humanos como malaria y dengue, haciendo que otras enfermedades transmitidas por mosquitos en esta región también tenga una alta prevalencia (Baldeviano *et al.*, 2015).

La dirofilariasis es una enfermedad cosmopolita, por eso ha sido estudiado en muchos países del Mundo. Referente al continente americano, un estudio realizado en México en 1706 perros de todo el país detectó una prevalencia serológica de 8.9 % (Movilla *et al.*, 2016). En el mismo país se realizó otro trabajo en la ciudad de Tabasco, utilizando como diagnóstico la técnica molecular de PCR, y se halló una prevalencia de 8 % en 1050 muestras de perros, además se demostró que los perros que vivían cerca de una gran fuente de agua estancada eran más propensos a presentar la infección (Torres-Chable *et al.*, 2018). Este último trabajo concuerda con nuestros datos al evaluar la relación entre el lugar de procedencia de los perros y la presencia de *D. immitis* demostramos que existe relación significativa entre ambas variables, ya que los perros del distrito de Puerto Pizarro tienen un OR de 10.8 ($p < 0.001$) en comparación a los perros de Garbanzal de tener antígenos para *Dirofilaria immitis*, así mismo, después de ajustar por lugar de crianza, la

categoría de perros de procedencia Puerto Pizarro sigue siendo significativa con un OR muy similar de 10.4 ($p < 0.001$), esto podría deberse a que este distrito presenta factores medioambientales que potencian la aparición del vector en ese caso los mosquitos ya que se encuentra rodeado de manglares y pozas de langostineras.

Un estudio anteriormente mencionado realizado en las ciudades de Medellín, Barranquilla y Cartagena en Colombia, registro una prevalencia de 1.6 % en perros mediante el diagnóstico serológico (SNAP, Idexx) (McCown *et al.*, 2015). En Ecuador, la ciudad de Santo Domingo de Tsáchilas un estudio encontró una prevalencia de 3 % en 100 perros provenientes de clínicas veterinarias de esta ciudad (Calvache, 2014). En las islas Galápagos se encontró una prevalencia de 6.9 % en 58 perros provenientes de una clínica veterinaria (Jiménez *et al.*, 2020), otro estudio realizado en la ciudad de Guayaquil donde se utilizó a perros callejeros se obtuvo una prevalencia de 5 % (Tutachá, 2016), estos datos, aunque presentan una prevalencia baja, determina unas cifras homogéneas en ese país. Por otro lado, Ecuador y la ciudad de Tumbes debido a su ubicación geográfica presentan ecosistemas semejantes se esperaría una prevalencia serológica similar con respecto a dirofilariasis en perros, sin embargo, no se ha encontrado un factor que determine las diferencias en cuanto a las prevalencias encontradas, siendo estos resultados muy por debajo de los valores encontrados en nuestro trabajo.

Con respecto a la borreliosis canina o enfermedad de Lyme, en el Perú se ha informado de personas seropositivas para *Borrelia burgdorferi*, causante de la Enfermedad de Lyme. Un estudio realizado en 35 agricultores de Piura determinó la presencia de 3 personas positivas a prueba serológica para *B. burgdorferi*, además se determinó que estas personas debido a su trabajo podrían ser víctimas de picaduras de garrapatas *Ixodes* sp. y *Haemaphysalis leporispalustris* (Macedo *et al.*, 1992), esta última especie ya había sido documentadas como vector de enfermedad de Lyme en estados unidos (Lane, 1988). Por otro lado, estas especies de garrapatas han sido documentadas en distintas regiones del Perú (Need *et al.*, 1991). Posterior a este trabajo se recolectó garrapatas de distintos departamentos, observándose espiroquetas semejantes a *B. burgdorferi* en el intestino de garrapatas *Haemaphysalis leporispalustris*. Sin embargo, los cultivos de estas mismas muestras fueron negativos (Macedo *et al.*, 1994), no obstante, estos estudios dejan en claro la presencia en nuestro país de vectores de espiroquetas causantes de la enfermedad de Lyme.

Recientemente se trabajó con 232 sueros humanos de los departamentos de Amazonas y Piura encontrándose una prevalencia de 9.9% para la enfermedad de Lyme, siendo Piura la de

mayor prevalencia (8.62%). Por otro lado, en este mismo estudio se analizó las especies de garrapatas presentes en animales domésticos como perros, cerdos, equinos, entre otros y las garrapatas encontradas fueron del género *Ixodes* y *Amblyomma*, que son consideradas vectores potenciales de la enfermedad de Lyme (Stromdahl *et al.*, 2003; Glenny *et al.*, 2004).

Los casos positivos para la borreliosis canina en América latina son limitados y escasos para anticuerpos *B. burgdorferi*, en Ecuador se ha presentado un caso de un perro positivo mediante prueba serológica SNAP 4Dx (Calvache, 2014). En nuestro país se han reportado dos perros seropositivos para la borreliosis canina en una clínica veterinaria de la ciudad de Lima (Rubio *et al.*, 2011). Los autores desconocen donde los perros pudieron haber tenido contacto con el vector de la enfermedad, el historial clínico de los pacientes indicaba que uno fue recogido en el distrito de Santa Anita en Lima y el otro paciente nació y vivió en los Estados Unidos, teniendo solamente un año de residencia en la ciudad de Lima. Es importante mencionar que garrapatas del género *Ixodes* sp. han sido reportadas en aves silvestres y roedores del departamento de Lima (Valle del Río Rímac y Huarochirí) (Townsend, 1913).

En este estudio no se encontró ningún perro con presencia de anticuerpos para *B. burgdorferi*, aunque los factores ambientales de la ciudad de Tumbes son muy semejantes a la ciudad de Piura. Se entienden que estas zonas son boscosas y presentan animales reservorios como el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Elías y Vásquez, 2016), considerados factores importantes para el cumplimiento del ciclo biológico y la presencia de esta enfermedad en una zona geográfica.

El 36% (61/169) presentaron seropositividad múltiple para anticuerpos de *A. phagocytophilum*/*A. platys* y *E. canis*/*E. ewingii*, esto se debería a la gran ocurrencia *R. sanguineus* en los caninos de Tumbes reportado por Núnton (2013). Asu vez se han observado trabajos que hallaron seropositividad a *A. phagocytophilum*/*A. platys* y *E. canis*/*E. ewingii*, los cuales fueron menores comparados a nuestro trabajo, 21.59% (19/88) Álvarez (2019) en Lambayeque; 4.2% (3/71) Naranjo (2018) en Piura y 30.1% (150/498) (Mc Cown *et al.*, 2015) en Colombia. Por otro lado, debemos resaltar el hallazgo de una prevalencia de 9.5% (16/169) de perros que presentaron anticuerpos para *A. phagocytophilum*/*A. platys* y *E. canis*/*E. ewingii* así como también antígenos de *D. immitis*.

VI. Conclusiones

- En el presente estudio se determinó las prevalencias de las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) en perros domésticos de zonas rurales de Tumbes, obteniéndose una prevalencia de 77.5% para *E. canis/E. ewingii*, 37.9% en el caso de *A. phagocytophilum/A. platys* y 26 % para *Dirofilaria immitis*.
- Las variables edad y lugar de crianza están asociados con la presencia de anticuerpos de *E. canis/E. ewingii* y antígeno de *Dirofilaria immitis*; además solo la variable raza está asociada con *E. canis/E. ewingii*; y solo la variable procedencia está asociada con *Dirofilaria immitis*.

VII. Bibliografía

1. **Abraham D, Grieve RB, Mika-Grieve M. 1988.** *Dirofilaria immitis*: surface properties of third- and fourth-stage larvae. Exp Parasitol. 65: 157-167. doi: 10.1016/0014-4894(88)90119-1.
2. **Acosta-Jamett G, Weitzel T, Lopez J, Alvarado D, Abarca K. 2020.** Prevalence and Risk Factors of Antibodies to Anaplasma spp. in Chile: A Household-Based Cross-Sectional Study in Healthy Adults and Domestic Dogs. Vector Borne Zoonotic Dis. doi: 10.1089/vbz.2019.2587.
3. **Acuña P, Chávez A. 2002.** Determinación de la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en los distritos de San Martín de Porres, Rímac y Cercado de Lima. Rev Inv Vet. 13: 108-110.
4. **Adrianzén J, Chávez A, Casas E, Li O. 2003.** Seroprevalencia de la *Dirofilariosis* y *Ehrlichiosis* canina en tres distritos de Lima. Rev Inv Vet. 14: 43-48.
5. **Albonico F, Loiacono M, Gioia G, Genchi C, Genchi M, Mortarino M. 2014.** Rapid differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood by real-time PCR coupled to high resolution melting analysis. Vet Parasitol. 200: 128-132. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.11.027.
6. **Alvarado-Rybak M, Solano-Gallego L, Millan J. 2016.** A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. Parasit Vectors. 9: 538. doi: 10.1186/s13071-016-1808-7.
7. **Álvarez G. 2019.** Hallazgos hematológicos y detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. en perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 88 p.

8. **Allison RW, Little SE. 2013.** Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet Clin Pathol.* 42: 127-144. doi: 10.1111/vcp.12040.
9. **Allsopp MT, Allsopp BA. 2001.** Novel Ehrlichia genotype detected in dogs in South Africa. *J Clin Microbiol.* 39: 4204-4207. doi: 10.1128/JCM.39.11.4204-4207.2001.
10. **Anderson RC. 2000.** Nematode parasites of vertebrates : their development and transmission. 2nd ed. Wallingford, Oxon, UK ; New York, NY. CABI Pub. xx, 650 p. p.
11. **Antonara S, Ristow L, Coburn J. 2011.** Adhesion mechanisms of *Borrelia burgdorferi*. *Adv Exp Med Biol.* 715: 35-49. doi: 10.1007/978-94-007-0940-9_3.
12. **Anziani OS, Ewing SA, Barker RW. 1990.** Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe Ehrlichieae by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. *Am J Vet Res.* 51: 929-931.
13. **Aroch I, Rojas A, Slon P, Lavy E, Segev G, Baneth G. 2015.** Serological cross-reactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of *Dirofilaria immitis* antigens with *Spirocerca lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis. *Vet Parasitol.* 211: 303-305. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.06.010.
14. **Atkins CE, DeFrancesco TC, Miller MW, Meurs KM, Keene B. 1998.** Prevalence of heartworm infection in cats with signs of cardiorespiratory abnormalities. *J Am Vet Med Assoc.* 212: 517-520.
15. **Bakken JS, Dumler JS. 2000.** Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis.* 31: 554-560. doi: 10.1086/313948.
16. **Bakken JS, Dumler S. 2008.** Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am.* 22: 433-448, viii. doi: 10.1016/j.idc.2008.03.011.
17. **Baldeviano GC, Okoth SA, Arrospide N, Gonzalez RV, Sanchez JF, Macedo S, Conde S, Tapia LL, Salas C, Gamboa D, Herrera Y, Edgel KA, Udhayakumar V, Lescano AG. 2015.** Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* Malaria Outbreak, Tumbes, Peru, 2010-2012. *Emerg Infect Dis.* 21: 797-803. doi: 10.3201/eid2105.141427.
18. **Barth C, Straubinger RK, Sauter-Louis C, Hartmann K. 2012.** Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 125: 337-344.
19. **Bartsch RC, Greene RT. 1996.** Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. *J Vet Intern Med.* 10: 271-274. doi: 10.1111/j.1939-1676.1996.tb02061.x.
20. **Bassett J. 2017.** McCurnin's Clinical Textbook for Veterinary Technicians. 9na ed. EEUU: Saunders. 1445 p.

21. **Bayer AM, Danysh HE, Garvich M, Gonzalez G, Checkley W, Alvarez M, Gilman RH. 2014.** An unforgettable event: a qualitative study of the 1997-98 El Nino in northern Peru. *Disasters*. 38: 351-374. doi: 10.1111/disa.12046.
22. **Bazzocchi C, Mortarino M, Grandi G, Kramer LH, Genchi C, Bandi C, Genchi M, Sacchi L, McCall JW. 2008.** Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *Int J Parasitol*. 38: 1401-1410. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.002.
23. **Beall MJ, Chandrashekar R, Eberts MD, Cyr KE, Diniz PP, Mainville C, Hegarty BC, Crawford JM, Breitschwerdt EB. 2008.** Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and Ehrlichia species in dogs from Minnesota. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 8: 455-464. doi: 10.1089/vbz.2007.0236.
24. **Beall MJ, Alleman AR, Breitschwerdt EB, Cohn LA, Couto CG, Dryden MW, Guptill LC, Iazbik C, Kania SA, Lathan P, Little SE, Roy A, Saylor KA, Stillman BA, Welles EG, Wolfson W, Yabsley MJ. 2012.** Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. *Parasit Vectors*. 5: 29. doi: 10.1186/1756-3305-5-29.
25. **Beatty BJ, Marquardt WC. 1996.** The biology of disease vectors. Niwot, Colo. University Press of Colorado. xv, 632 p. p.
26. **Beckerd N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. 2010.** Mosquitoes and their control. 2nd ed. Heidelberg. Springer. 577 p. p.
27. **Becskei C, Geurden T, Liebenberg J, Cuppens O, Mahabir SP, Six RH. 2016.** Comparative speed of kill of oral treatments with Simparica (sarolaner) and Bravecto(R)(fluralaner) against induced infestations of *Rhipicephalus sanguineus* on dogs. *Parasit Vectors*. 9: 103. doi: 10.1186/s13071-016-1376-x.
28. **Berger BW, Johnson RC, Kodner C, Coleman L. 1995.** Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from human tick bite sites: a guide to the risk of infection. *J Am Acad Dermatol*. 32: 184-187. doi: 10.1016/0190-9622(95)90123-x.
29. **Berrada ZL, Telford SR, 3rd. 2009.** Burden of tick-borne infections on American companion animals. *Top Companion Anim Med*. 24: 175-181. doi: 10.1053/j.tcam.2009.06.005.
30. **Beugnet F, Marie JL. 2009.** Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol*. 163: 298-305. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.03.028.
31. **Blanco JR, Oteo JA. 2002.** Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 8: 763-772. doi: 10.1046/j.1469-0691.2002.00557.x.

32. **Bowman AS, Patricia AN. 2008.** Ticks : biology, disease, and control New York. Cambridge University Press. 517 p.
33. **Bowman DD, Atkins CE. 2009.** Heartworm biology, treatment, and control. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 39: 1127-1158, vii. doi: 10.1016/j.cvsm.2009.06.003.
34. **Bowman DD, Mannella C. 2011.** Macrocyclic lactones and *Dirofilaria immitis* microfilariae. Top Companion Anim Med. 26: 160-172. doi: 10.1053/j.tcam.2011.07.001.
35. **Bowman DD. 2014.** Georgis' parasitology for veterinarians. 10th ed. St. Louis, Mo. Saunders/Elsevier. 499p. p.
36. **Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. 1998.** Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J Clin Microbiol. 36: 2645-2651.
37. **Brisson D, Dykhuizen DE, Ostfeld RS. 2008.** Conspicuous impacts of inconspicuous hosts on the Lyme disease epidemic. Proc Biol Sci. 275: 227-235. doi: 10.1098/rspb.2007.1208.
38. **Bruce-Chwatt LJ, Zulueta Jd. 1980.** The rise and fall of malaria in Europe : a historic-epidemiological study. English language ed. Oxford ; New York. Oxford University Press. xvi, 240 p., 248 p. of plates p.
39. **Brunner CJ, Hendrix CM, Blagburn BL, Hanrahan LA. 1988.** Comparison of serologic tests for detection of antigen in canine heartworm infections. J Am Vet Med Assoc. 192: 1423-1427.
40. **Calvache H. 2014.** Identificación de hemoparásitos mediante "Snap diagnóstico 4dx Plus" (IDEXX) en caninos comprendidos entre dos meses a doce años, en clínicas veterinarias urbanas de la ciudad de Santo domingo de los Tsáchilas. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Quito: Universidad de las Americas. 177 p.
41. **Calvert CA, Losonsky JM. 1985.** Pneumonitis associated with occult heartworm disease in dogs. J Am Vet Med Assoc. 186: 1097-1098.
42. **Cancrini G, Scaramozzino P, Gabrielli S, Di Paolo M, Toma L, Romi R. 2007.** *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* implicated as natural vectors of *Dirofilaria repens* in central Italy. J Med Entomol. 44: 1064-1066. doi: 10.1603/0022-2585(2007)44[1064:aaacpi]2.0.co;2.
43. **Capelli G, Frangipane di Regalbono A, Simonato G, Cassini R, Cazzin S, Cancrini G, Otranto D, Pietrobelli M. 2013.** Risk of canine and human exposure to *Dirofilaria immitis* infected mosquitoes in endemic areas of Italy. Parasit Vectors. 6: 60. doi: 10.1186/1756-3305-6-60.

44. **Carlos E. 2019.** Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en canes (*Canis familiaris*) en los anexos del distrito de Santa Rosa - VRAEM. Tesis de Médico Veterinario Ayacucho Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 53 p.
45. **Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE. 2009.** Canine granulocytic anaplasmosis: a review. J Vet Intern Med. 23: 1129-1141. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x.
46. **Cervantes M, Masgo D, Ramírez L, Álvarez G, Li O, Vasquez A, Gomez L, Hoyos L.** Identificación morfológica y molecular de garrapatas colectadas de perros (*Canis lupus familiaris*) con ehrlichiosis en Chiclayo, Peru. 2020. Rev Inv Vet. 31(2): e17820. doi: <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17820>
47. **Conlon JA, Mather TN, Tanner P, Gallo G, Jacobson RH. 2000.** Efficacy of a nonadjuvanted, outer surface protein A, recombinant vaccine in dogs after challenge by ticks naturally infected with *Borrelia burgdorferi*. Vet Ther. 1: 96-107.
48. **Corimanya J, Chávez A, Casas E, Diaz D. 2004.** Frecuencia de *Dirofilaria immitis* en caninos del distrito de San Juan de Lurigancho. Rev Inv Vet. 15: 141-144.
49. **Courtney CH, Cornell JA. 1990.** Evaluation of heartworm immunodiagnostic tests. J Am Vet Med Assoc. 197: 724-729.
50. **Courtney CH, Zeng Q. 2001a.** Comparison of heartworm antigen test kit performance in dogs having low heartworm burdens. Vet Parasitol. 96: 317-322. doi: 10.1016/s0304-4017(01)00374-0.
51. **Courtney CH, Zeng QY. 2001b.** Relationship between microfilaria count and sensitivity of the direct smear for diagnosis of canine dirofilariosis. Vet Parasitol. 94: 199-204. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00377-0.
52. **Coutte L, Botkin DJ, Gao L, Norris SJ. 2009.** Detailed analysis of sequence changes occurring during vlsE antigenic variation in the mouse model of *Borrelia burgdorferi* infection. PLoS Pathog. 5: e1000293. doi: 10.1371/journal.ppat.1000293.
53. **Chang WL, Su WL, Pan MJ. 1997.** Two-step PCR in the evaluation of antibiotic treatment for *Ehrlichia platys* infection. J Vet Med Sci. 59: 849-851. doi: 10.1292/jvms.59.849.
54. **Chipana C, Chávez A, Casas E, Suárez F. 2002.** Estudio de la dirofilariosis canina en la ribera del río chillón, lima. Rev Inv Vet. 13: 72-76.
55. **Chou J, Wunschmann A, Hodzic E, Borjesson DL. 2006.** Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in tissues from dogs with presumptive Lyme borreliosis. J Am Vet Med Assoc. 229: 1260-1265. doi: 10.2460/javma.229.8.1260.
56. **Dambach DM, Smith CA, Lewis RM, Van Winkle TJ. 1997.** Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs

- putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987-1992). Vet Pathol. 34: 85-96. doi: 10.1177/030098589703400201.
57. **Dantas-Torres F. 2008.** The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. Vet Parasitol. 152: 173-185. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.12.030.
 58. **Dantas-Torres F, Otranto D. 2013.** Dirofilariosis in the Americas: a more virulent *Dirofilaria immitis*? Parasit Vectors. 6: 288. doi: 10.1186/1756-3305-6-288.
 59. **Darsie RF, Ward RA. 2005.** Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico. Gainesville, FL. University of Florida Press.
 60. **Day MJ. 2016.** Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. Second edition. ed. xii, 220 pages p.
 61. **Delgado N, Montoya A. 2018.** Influencia de la edad y el sexo sobre la prevalencia de anaplasma spp. en caninos (*canis familiaris*) atendidos en clinicas veterinarias en los distritos de José Leonardo Ortiz, La Victoria y Chiclayo. Julio -diciembre 2017. Tesis de Médico Veterinario. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 91 p.
 62. **Dillon A, Brawner W, Hanrahan L. 1995a.** Influence of number of parasites and exercise on the severity of heartworm disease in dogs. En: Sol M Ed. Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium '95., American Heartworm Society, Batavia, IL. p 113.
 63. **Dillon A, Warner A, Molina R. 1995b.** Pulmonary parenchymal changes in dogs and cats after experimental transplantation of dead *Dirofilaria immitis*. En: Sol M Ed. Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium '95., American Heartworm Society, Batavia, IL. p 97-101.
 64. **Dingman P, Levy JK, Kramer LH, Johnson CM, Lappin MR, Greiner EC, Courtney CH, Tucker SJ, Morchon R. 2010.** Association of Wolbachia with heartworm disease in cats and dogs. Vet Parasitol. 170: 50-60. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.01.037.
 65. **Dohoo I, Martin W, Stryhn H. 2003.** Veterinary epidemiologic research. Canada: AVC Inc. p 799.
 66. **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001.** Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol. 51: 2145-2165. doi: 10.1099/00207713-51-6-2145.

67. **Eddlestone SM, Gaunt SD, Neer TM, Boudreaux CM, Gill A, Haschke E, Corstvet RE. 2007.** PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. *Exp Parasitol.* 115: 205-210. doi: 10.1016/j.exppara.2006.08.006.
68. **Egenvall A, Bjoersdorff A, Lilliehook I, Olsson Engvall E, Karlstam E, Artursson K, Hedhammar A, Gunnarsson A. 1998.** Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish Ehrlichia species isolate. *Vet Rec.* 143: 412-417. doi: 10.1136/vr.143.15.412.
69. **Egenvall A, Lilliehook I, Bjoersdorff A, Engvall EO, Karlstam E, Artursson K, Heldtander M, Gunnarsson A. 2000.** Detection of granulocytic Ehrlichia species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet Rec.* 146: 186-190. doi: 10.1136/vr.146.7.186.
70. **Egenvall AE, Hedhammar AA, Bjoersdorff AI. 1997.** Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec.* 140: 222-226. doi: 10.1136/vr.140.9.222.
71. **Eldridge BF, Edman JD. 2003.** Medical entomology : a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods. Rev. ed. Dordrecht ; Boston. Kluwer Academic Publishers. x, 659 p. p.
72. **Elías R, Vásquez P. 2016.** Protocolo Sanitario para Venados Cola Blanca (*Odocoileus virginianus peruvianus*) del Sector Sauce Grande - Coto de Caza El Angolo, Piura, Perú. *Rev Inv Vet.* 27: 531-538. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i3.12001>.
73. **Embers ME, Liang FT, Howell JK, Jacobs MB, Purcell JE, Norris SJ, Johnson BJ, Philipp MT. 2007.** Antigenicity and recombination of VlsE, the antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*, in rabbits, a host putatively resistant to long-term infection with this spirochete. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 50: 421-429. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00276.x.
74. **Eschner AK. 2008.** Effect of passive immunoglobulin transfer on results of diagnostic tests for antibodies against *Borrelia burgdorferi* in pups born to a seropositive dam. *Vet Ther.* 9: 184-191.
75. **Estares LA. 1999.** Prevalencia de ectoparásitos en *Canis familiaris* en los distritos de San Juan de Lurigancho, San Martín de Porres, Comas e Independencia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 61p.
76. **Foley JE, Foley P, Madigan JE. 2001.** Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. *Am J Vet Res.* 62: 1599-1605. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.1599.
77. **Gaunt S, Beall M, Stillman B, Lorentzen L, Diniz P, Chandrashekar R, Breitschwerdt E. 2010.** Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia*

- canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasit Vectors*. 3: 33. doi: 10.1186/1756-3305-3-33.
78. **Geiger J, Morton BA, Vasconcelos EJR, Tngrian M, Kachani M, Barron EA, Gavidia CM, Gilman RH, Angulo NP, Lerner R, Scott T, Mirrashed NH, Oakley B, Diniz P. 2018.** Molecular Characterization of Tandem Repeat Protein 36 Gene of *Ehrlichia canis* Detected in Naturally Infected Dogs from Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 99: 297-302. doi: 10.4269/ajtmh.17-0776.
 79. **Genchi C, Kramer LH, Rivasi F. 2011.** *Dirofilaria immitis* infections in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 11: 1307-1317. doi: 10.1089/vbz.2010.0247.
 80. **Genchi C, Kramer LH. 2019.** The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World. *Vet Parasitol*. 280: 108995. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.108995.
 81. **Gioia G, Lecova L, Genchi M, Ferri E, Genchi C, Mortarino M. 2010.** Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Vet Parasitol*. 172: 160-163. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.04.027.
 82. **Glenny M, Mendoza L, Falconí E. 2004.** Detección de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* e identificación de garrapatas ixodidas en Piura Y Amazonas, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 20: 23-27.
 83. **Goldman EE, Breitschwerdt EB, Grindem CB, Hegarty BC, Walls JJ, Dumler JS. 1998.** Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med*. 12: 61-70. doi: 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02096.x.
 84. **Goodwin JK. 1998.** The serologic diagnosis of heartworm infection in dogs and cats. *Clin Tech Small Anim Pract*. 13: 83-87. doi: 10.1016/S1096-2867(98)80011-X.
 85. **Granick JL, Armstrong PJ, Bender JB. 2009.** *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). *J Am Vet Med Assoc*. 234: 1559-1565. doi: 10.2460/javma.234.12.1559.
 86. **Grauer GF, Culham CA, Cooley AJ, Poff BC, Oberley TD, Brownfield MS, Grieve RB. 1987.** Clinicopathologic and histologic evaluation of *Dirofilaria immitis*-induced nephropathy in dogs. *Am J Trop Med Hyg*. 37: 588-596. doi: 10.4269/ajtmh.1987.37.588.
 87. **Grauer GF, Burgess EC, Cooley AJ, Hagee JH. 1988.** Renal lesions associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 193: 237-239.
 88. **Greene C, Straubinger R, Levy S. 2012.** Borreliosis. En: Saunders E Ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4th. St. Louis. p 447-465.

89. **Greene C. 2012.** Infectious diseases of the dog and cat. 4Th ed. St. Louis, Mo. Saunders/Elsevier. 1383p. p.
90. **Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS. 1996.** Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. J Clin Microbiol. 34: 44-48.
91. **Grimm D, Tilly K, Byram R, Stewart PE, Krum JG, Bueschel DM, Schwan TG, Policastro PF, Elias AF, Rosa PA. 2004.** Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 3142-3147. doi: 10.1073/pnas.0306845101.
92. **Hanincova K, Taragelova V, Koci J, Schafer SM, Hails R, Ullmann AJ, Piesman J, Labuda M, Kurtenbach K. 2003.** Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. Appl Environ Microbiol. 69: 2825-2830. doi: 10.1128/aem.69.5.2825-2830.2003.
93. **Harrus S, Waner T, Avidar Y, Bogin E, Peh H, Bark H. 1996.** Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. Vet Parasitol. 66: 241-249. doi: 10.1016/s0304-4017(96)01013-8.
94. **Harrus S, Kass PH, Klement E, Waner T. 1997a.** Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. Vet Rec. 141: 360-363. doi: 10.1136/vr.141.14.360.
95. **Harrus S, Waner T, Bark H. 1997b.** Canine monocytic ehrlichiosis: an update. Compend Contin Educ Pract Vet. 19: 431-444.
96. **Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H. 1998.** Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. J Clin Microbiol. 36: 73-76.
97. **Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen AW. 1999.** Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 37: 2745-2749.
98. **Harrus S, Kenny M, Miara L, Aizenberg I, Waner T, Shaw S. 2004.** Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. Antimicrob Agents Chemother. 48: 4488-4490. doi: 10.1128/AAC.48.11.4488-4490.2004.
99. **Harrus S, Waner T. 2011.** Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. Vet J. 187: 292-296. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.02.001.
100. **Harrus S, Waner T, Neer R. 2012.** *Ehrlichia canis* infection En: Infectious diseases of the dog and cat. St. Louis, Mo., Saunders/Elsevier. p 227-238.

101. **Harvey J. 2012.** *Anaplasma platys* infection. En: C. G Ed. Infectious diseases of the dog and cat. 4th. MO, ed. St. Louis Elsevier Saunders. p 256-258.
102. **Henry LG, Brunson KJ, Walden HS, Wenzlow N, Beachboard SE, K LB, Long MT. 2018.** Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy-confirmed heartworm status. Vet Parasitol. 254: 178-182. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.02.037.
103. **Horak IG, Camicas JL, Keirans JE. 2002.** The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. Exp Appl Acarol. 28: 27-54. doi: 10.1023/a:1025381712339.
104. **Hovius KE, Stark LA, Bleumink-Pluym NM, van de Pol I, Verbeek-de Kruif N, Rijpkema SG, Schouls LM, Houwers DJ. 1999.** Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs, as detected by polymerase chain reaction. Vet Q. 21: 54-58. doi: 10.1080/01652176.1999.9694992.
105. **Hoyos L, L   O, Alvarado A, Suárez F, Díaz D. 2007.** Evaluación del examen hematológico en el diagnóstico de ehrlichiosis canina. Rev Inv Vet. 18: 129-135.
106. **Hoyos L. 2013.** Identificación hematológica, serológica y molecular de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* en sangre periférica de humanos en Lima Metropolitana. Tesis para optar por el grado de magíster en Microbiología. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
107. **Huamán AM, Jara CA. 2017.** Ectoparásitos de *Canis familiaris*: Prevalencia de infestación en dos zonas de Trujillo, Perú.2015. REBIOL 37: 19-24.
108. **Huerto-Medina E, Damaso-Mata B. 2015.** Factores asociados a la infección por *Ehrlichia canis* en perros infestados con garrapatas en la ciudad de Huanuco, Peru. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 32: 756-760.
109. **Hutton TA, Goldstein RE, Njaa BL, Atwater DZ, Chang YF, Simpson KW. 2008.** Search for *Borrelia burgdorferi* in kidneys of dogs with suspected "Lyme nephritis". J Vet Intern Med. 22: 860-865. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0131.x.
110. **Hynote ED, Mervine PC, Stricker RB. 2012.** Clinical evidence for rapid transmission of Lyme disease following a tickbite. Diagn Microbiol Infect Dis. 72: 188-192. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.10.003.
111. **IDEXX-Laboratories. 2020.** Recursos y prospecto de la prueba SNAP 4Dx Plus. [Internet], [15 enero 2020]. Disponible en: <https://www.idexx.es/es/veterinary/support/documents-resources/snap-4dx-plus-test-resources/>

112. **Indest KJ, Howell JK, Jacobs MB, Scholl-Meeker D, Norris SJ, Philipp MT. 2001.** Analysis of *Borrelia burgdorferi* vlsE gene expression and recombination in the tick vector. Infect Immun. 69: 7083-7090. doi: 10.1128/IAI.69.11.7083-7090.2001.
113. **Inokuma H, Raoult D, Brouqui P. 2000.** Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. J Clin Microbiol. 38: 4219-4221.
114. **Iqbal Z, Chaichanasiriwithaya W, Rikihisa Y. 1994.** Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 32: 1658-1662.
115. **Jara M. 2014.** Frecuencia de *Ehrlichia canis* en caninos de la ciudad de chimbote - 2013 Tesis de Médico Veterinario. Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca. 41 p.
116. **Jiménez IA, Vega Marino PA, Stapleton GS, Prieto JB, Bowman DD. 2020.** Canine vector-borne disease in domestic dogs on Isla Santa Cruz, Galapagos. Vet Parasitol Reg Stud Reports. 19: 100373. doi: 10.1016/j.vprsr.2020.100373.
117. **Kitoh K, Oka A, Kitagawa H, Unno T, Komori S, Sasaki Y. 2001.** Relaxing and contracting activities of heartworm extract on isolated canine abdominal aorta. J Parasitol. 87: 522-526. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0522:RACAOH]2.0.CO;2.
118. **Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K. 2008.** Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. J Vet Intern Med. 22: 1289-1295. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0180.x.
119. **Kotani T, Powers KG. 1982.** Developmental stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. Am J Vet Res. 43: 2199-2206.
120. **Kramer L, Grandi G, Passeri B, Gianelli P, Genchi M, Dzimianski MT, Supakorndej P, Mansour AM, Supakorndej N, McCall SD, McCall JW. 2011.** Evaluation of lung pathology in *Dirofilaria immitis*-experimentally infected dogs treated with doxycycline or a combination of doxycycline and ivermectin before administration of melarsomine dihydrochloride. Vet Parasitol. 176: 357-360. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.01.021.
121. **Krupka I, Straubinger RK. 2010.** Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 40: 1103-1119. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.07.011.
122. **Lane RS. 1988.** Lyme borreliosis in California. Acarological, clinical, and epidemiological studies. ANN NY ACAD SCI. 539: 192-203. doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb31853.x.
123. **Leschnik MW, Kirtz G, Khanakah G, Duscher G, Leidinger E, Thalhammer JG, Joachim A, Stanek G. 2010.** Humoral immune response in dogs naturally infected with *Borrelia burgdorferi sensu lato* and in dogs after immunization with a *Borrelia* vaccine. Clin Vaccine Immunol. 17: 828-835. doi: 10.1128/CVI.00427-09.

124. **Liang FT, Philipp MT. 1999.** Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 67: 6702-6706.
125. **Liang FT, Aberer E, Cinco M, Gern L, Hu CM, Lobet YN, Ruscio M, Voet PE, Jr., Weynants VE, Philipp MT. 2000a.** Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* SL. *J Infect Dis.* 182: 1455-1462. doi: 10.1086/315862.
126. **Liang FT, Jacobson RH, Straubinger RK, Grooters A, Philipp MT. 2000b.** Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 38: 4160-4166.
127. **Little SE, Heise SR, Blagburn BL, Callister SM, Mead PS. 2010.** Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. *Trends Parasitol.* 26: 213-218. doi: 10.1016/j.pt.2010.01.006.
128. **Little SE, Bowman DD. 2013.** Vector-Borne Diseases. En: Saunders E Ed. *GEORGIS' PARASITOLOGY FOR VETERINARIANS.* 10Th. St. Louis. p 241-259.
129. **Littman MP, Goldstein RE, Labato MA, Lappin MR, Moore GE. 2006.** ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med.* 20: 422-434. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[422:asacso]2.0.co;2.
130. **Love B, Jones R. 2012.** Mycoplasmal and Bacterial Diseases. En: Saunders E Ed. *INFECTIOUS DISEASES OF THE DOG AND CAT.* 4Th. St. Louis. p 543-552.
131. **Ludders JW, Grauer GF, Dubielzig RR, Ribble GA, Wilson JW. 1988.** Renal microcirculatory and correlated histologic changes associated with dirofilariasis in dogs. *Am J Vet Res.* 49: 826-830.
132. **Macedo S, Cuadra A, Cáceres I, Elliot A, Avila G, Arévalo J, Romero G, Chumacero M. 1992.** Diagnóstico serológico (ELISA) de Borreliosis de Lyme en un grupo humano de riesgo, Piura-Perú. *Rev.Per.Med.Trop.* 6: 31-37.
133. **Macedo S, Cuadra A, Arévalo J, Jove I. 1994.** Borreliosis de Lyme: Probables vectores implicados en la transmisión del agente etiológico. *Rev.Per.Med.Trop.* 8: 27-32.
134. **Maggi RG, Kramer F. 2019.** A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasit Vectors.* 12: 145. doi: 10.1186/s13071-019-3407-x.
135. **Magnarelli LA, Levy SA, Ijdo JW, Wu C, Padula SJ, Fikrig E. 2001.** Reactivity of dog sera to whole-cell or recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* by ELISA and immunoblot analysis. *J Med Microbiol.* 50: 889-895. doi: 10.1099/0022-1317-50-10-889.

136. **Marquez F, Hidalgo A, Contreras F, Rodriguez J, Muniain M. 2005.** Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 23: doi: 10.1157/13071613.
137. **Martínez M, Arraga-Alvarado C, Triana-Alonso F, Ruiz J, Gutiérrez C. 2015.** Estudio serológico y molecular de *Ehrlichia canis* en perros de una comunidad del estado Aragua, Venezuela. *Rev Inv Vet.* 26: 648-656.
138. **Martini M, Capelli G, Poglayen G, Bertotti F, Turilli C. 1996.** The validity of some haematological and ELISA methods for the diagnosis of canine heartworm disease. *Vet Res Commun.* 20: 331-339. doi: 10.1007/bf00366539.
139. **Masgo D. 2018.** Detección hematológica de *Anaplasma phagocytophilum* en caballos de la provincia de Chiclayo (departamento de Lambayeque, Perú). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 92 p.
140. **Mathema VB, Manzoor Z, Koo JE, Koh YS. 2013.** Inhibition of cell death of bone marrow-derived macrophages infected with *Ehrlichia muris*. *Ticks Tick Borne Dis.* 4: 185-190. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.11.011.
141. **Mathew JS, Ewing SA, Barker RW, Fox JC, Dawson JE, Warner CK, Murphy GL, Kocan KM. 1996.** Attempted transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* after passage in cell culture. *Am J Vet Res.* 57: 1594-1598.
142. **May C, Bennett D, Carter S. 1990.** Lyme disease in dogs and cats. *Vet Rec.* 127: 435.
143. **McBride JW, Corstvet RE, Gaunt SD, Boudreaux C, Guedry T, Walker DH. 2003.** Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect Immun.* 71: 2516-2524. doi: 10.1128/iai.71.5.2516-2524.2003.
144. **McBride JW, Walker DH. 2011.** Molecular and cellular pathobiology of Ehrlichia infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. *Expert Rev Mol Med.* 13: e3. doi: 10.1017/S1462399410001730.
145. **McCall JW. 2005.** The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: a review, an update, and recommendations. *Vet Parasitol.* 133: 197-206. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.04.005.
146. **McCall JW, Baker CF, Mather TN, Chester ST, McCall SD, Irwin JP, Young SL, Cramer LG, Pollmeier MG. 2011.** The ability of a topical novel combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene to protect dogs from *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* infections transmitted by *Ixodes scapularis*. *Vet Parasitol.* 179: 335-342. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.046.

147. **McCown M, Monterroso V, Cardona W. 2015.** Monitoreo de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, y *Dirofilaria immitis* en perros de tres ciudades en Colombia. *Ces. Med. Vet.* 10: 224-231.
148. **McTier TL, Chubb N, Curtis MP, Hedges L, Inskip GA, Knauer CS, Menon S, Mills B, Pullins A, Zinser E, Woods DJ, Meeus P. 2016.** Discovery of sarolaner: A novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. *Vet Parasitol.* 222: 3-11. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.02.019.
149. **McHaffie J. 2012.** *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia pipientis*: a thorough investigation of the symbiosis responsible for canine heartworm disease. *Parasitol Res.* 110: 499-502. doi: 10.1007/s00436-011-2644-5.
150. **Morchon R, Carreton E, Grandi G, Gonzalez-Miguel J, Montoya-Alonso JA, Simon F, Genchi C, Kramer LH. 2012.** Anti-Wolbachia Surface Protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12: 17-20. doi: 10.1089/vbz.2010.0211.
151. **Moroff S, Woodruff C, Woodring T, Sokolchik I, Lappin MR. 2015.** Multiple antigen target approach using the Accuplex4 BioCD system to detect *Borrelia burgdorferi* antibodies in experimentally infected and vaccinated dogs. *J Vet Diagn Invest.* 27: 581-588. doi: 10.1177/1040638715600196.
152. **Movilla R, Garcia C, Siebert S, Roura X. 2016.** Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico. *Parasit Vectors.* 9: 421. doi: 10.1186/s13071-016-1686-z.
153. **Muir P, Oldenhoff WE, Hudson AP, Manley PA, Schaefer SL, Markel MD, Hao Z. 2007.** Detection of DNA from a range of bacterial species in the knee joints of dogs with inflammatory knee arthritis and associated degenerative anterior cruciate ligament rupture. *Microb Pathog.* 42: 47-55. doi: 10.1016/j.micpath.2006.10.002.
154. **Mullen GR, Durden LA. 2019.** Medical and veterinary entomology. 3rd edition. ed. San Diego, CA. Academic Press/Elsevier. 792 p.
155. **Munoz-Leal S, Lopes MG, Marcili A, Martins TF, Gonzalez-Acuna D, Labruna MB. 2019.** Anaplasmatidae, Borrelia and Hepatozoon agents in ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) from Chile. *Acta Trop.* 192: 91-103. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.02.002.
156. **Mylonakis ME, Koutinas AF, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Billinis CD, Leontides LS, Kontos VS. 2004.** Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 40: 174-184. doi: 10.5326/0400174.
157. **Mylonakis ME, Harrus S, Breitschwerdt EB. 2019.** An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Vet J.* 246: 45-53. doi: 10.1016/j.tvjl.2019.01.015.

158. **Naranjo N. 2018.** Frecuencia de Erliquiosis y Anaplasmosis en canes con historial de garrapatas atendidos en una Clínica Veterinaria particular en la provincia de Piura, Perú durante el período primavera- verano 2017/2018. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 100 p.
159. **Nava S, Guglielmone AA. 2013.** A meta-analysis of host specificity in Neotropical hard ticks (Acari: Ixodidae). Bull Entomol Res. 103: 216-224. doi: 10.1017/S0007485312000557.
160. **Need JT, Dale WE, Keirans JE, Dasch GA. 1991.** Annotated list of ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) reported in Peru: distribution, hosts, and bibliography. J Med Entomol. 28: 590-597. doi: 10.1093/jmedent/28.5.590.
161. **Nelson RW, Couto CG. 2014.** Small animal internal medicine. 5a ed. Canada: Elsevier. 1509 p.
162. **Nelson T, McCall J, Jones S, Moorhead A. 2020.** Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. [Internet], [15 enero, American Heartworm Society]. Disponible en: www.heartwormsociety.org
163. **Nethery KA, Doyle CK, Zhang X, McBride JW. 2007.** Ehrlichia canis gp200 contains dominant species-specific antibody epitopes in terminal acidic domains. Infect Immun. 75: 4900-4908. doi: 10.1128/IAI.00041-07.
164. **Nuntón J, Quintana H, Vivar E. 2013.** Prevalence of ectoparasites and endoparasites in *Canis familiaris* slaughtered in Tumbes; July to December, 2013. Revista Manglar. 10: 93-97. doi: <http://dx.doi.org/10.17268/manglar.2013.011>.
165. **O'Connor TP. 2015.** SNAP Assay Technology. Top Companion Anim Med. 30: 132-138. doi: 10.1053/j.tcam.2015.12.002.
166. **O'Connor T, Lawrence J, Andersen P, Leathers V, E. W. 2013.** Immunoassay applications in veterinary diagnostics. En: Wild D Ed. The immunoassay handbook : theory and applications of ligand binding, ELISA, and related techniques. 4th. Oxford ; Waltham, MA, Elsevier. p 623.
167. **Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM. 2001.** Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 670-675. doi: 10.1073/pnas.98.2.670.
168. **Otranto D, Paradies P, Testini G, Latrofa MS, Weigl S, Cantacessi C, Mencke N, de Caprariis D, Parisi A, Capelli G, Stanneck D. 2008.** Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions. Vet Parasitol. 153: 320-328. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.02.008.

169. **Otranto D, Wall R. 2008.** New strategies for the control of arthropod vectors of disease in dogs and cats. *Med Vet Entomol.* 22: 291-302. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00741.x.
170. **Otranto D, Eberhard ML. 2011.** Zoonotic helminths affecting the human eye. *Parasit Vectors.* 4: 41. doi: 10.1186/1756-3305-4-41.
171. **Otranto D. 2018.** Arthropod-borne pathogens of dogs and cats: From pathways and times of transmission to disease control. *Vet Parasitol.* 251: 68-77. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.12.021.
172. **Paes-de-Almeida EC, Ferreira AM, Labarthe NV, Caldas ML, McCall JW. 2003.** Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *Vet Parasitol.* 113: 157-168. doi: 10.1016/s0304-4017(03)00020-7.
173. **Paico C. 2018.** Prevalencia de anaplasmosis en caninos atendidos en la clínica veterinaria Pet's Park, La Victoria, septiembre 2016 – septiembre 2017. Tesis de Médico Veterinario. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 67 p.
174. **Pereira LS, Oliveira PL, Barja-Fidalgo C, Daffre S. 2001.** Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Parasitol.* 99: 66-72. doi: 10.1006/expr.2001.4657.
175. **Perez-Macchi S, Pedrozo R, Bittencourt P, Muller A. 2019.** Prevalence, molecular characterization and risk factor analysis of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domestic dogs from Paraguay. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 62: 31-39. doi: 10.1016/j.cimid.2018.11.015.
176. **Pesapane R, Foley J, Thomas R, Castro LR. 2019.** Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from northern Colombia. *Vet Microbiol.* 233: 184-189. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.05.002.
177. **Piesman J, Dolan MC, Happ CM, Luft BJ, Rooney SE, Mather TN, Golde WT. 1997.** Duration of immunity to reinfection with tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* in naturally infected mice. *Infect Immun.* 65: 4043-4047.
178. **Pinedo R. 2018.** Prevalencia de anticuerpos de *Ehrlichia canis* determinado por el ensayo inmunocromatográfico en *Canis lupus familiaris* del caserio de “Pechichal” – Tumbes. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Tumbes: Universidad Nacional de Tumbes. 64 p.
179. **Plier ML, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Kidd LB. 2009.** Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. *J Am Anim Hosp Assoc.* 45: 232-238. doi: 10.5326/0450232.

180. **Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ, Holland CJ, Shukla SK. 2005.** Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. J Clin Microbiol. 43: 796-801. doi: 10.1128/JCM.43.2.796-801.2005.
181. **Quenta Y. 2013.** Estudio epidemiológico de la prevalencia de ehrlichiosis canina en la zona urbana de la ciudad de Tacna 2013. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann 95 p.
182. **Rabanal L. 2014.** Prevalencia de *Ehrlichia* sp., en caninos infestados con garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*), mediante frotis sanguíneo en la provincia de Trujillo. Tesis de Médico Veterinario. Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca. 60 p.
183. **Rawlings CA. 1986.** Heartworm disease in dogs and cats. Philadelphia. Saunders. vi, 329 p.
184. **Rikihisa Y. 1991.** The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. Clin Microbiol Rev. 4: 286-308. doi: 10.1128/cmr.4.3.286.
185. **Rikihisa Y, Ewing SA, Fox JC. 1994.** Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. J Clin Microbiol. 32: 2107-2112.
186. **Rikihisa Y. 2006.** Ehrlichia subversion of host innate responses. Curr Opin Microbiol. 9: 95-101. doi: 10.1016/j.mib.2005.12.003.
187. **Rohrbach BW, Odoi A, Patton S. 2011.** Risk factors associated with failure of heartworm prophylaxis among members of a national hunting dog club. J Am Vet Med Assoc. 238: 1150-1158. doi: 10.2460/javma.238.9.1150.
188. **Rubio A, Salas E, Gómez G. 2011.** Presencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* y *Anaplasma* sp. en canes de la ciudad de Lima. Rev Inv Vet Perú. 22: 233-238.
189. **Sainz A, Roura X, Miro G, Estrada-Pena A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L. 2015.** Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasit Vectors. 8: 75. doi: 10.1186/s13071-015-0649-0.
190. **Sanogo YO, Davoust B, Inokuma H, Camicas JL, Parola P, Brouqui P. 2003.** First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. Onderstepoort J Vet Res. 70: 205-212.
191. **Schnyder M, Deplazes P. 2012.** Cross-reactions of sera from dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* in commercially available *Dirofilaria immitis* test kits. Parasit Vectors. 5: 258. doi: 10.1186/1756-3305-5-258.

192. **Schwaiger M, Peter O, Cassinotti P. 2001.** Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. Clin Microbiol Infect. 7: 461-469. doi: 10.1046/j.1198-743x.2001.00282.x.
193. **Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA. 1995.** Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 2909-2913. doi: 10.1073/pnas.92.7.2909.
194. **SENAMHI. 2020.** Información tiempo y clima para Tumbes. [Internet], [15 marzo 2020]. Disponible en: <https://www.senamhi.gob.pe/?p=pronostico-detalle-turistico&localidad=0002>
195. **Service MW. 1993.** Mosquito ecology : field sampling methods. 2nd ed. London ; New York. Elsevier Applied Science. xiii, 988 p. p.
196. **Service MW. 2012.** Medical entomology for students. 5th ed. Cambridge. Cambridge University Press. x, 303 p., 316 p. of col. plates p.
197. **Shimada T, Ishida Y, Shimizu M, Nomura M, Kawato K, Iguchi K, Jinbo T. 2002.** Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. Vet Res Commun. 26: 171-177. doi: 10.1023/a:1015290903332.
198. **Simon F, Morchon R, Gonzalez-Miguel J, Marcos-Atxutegi C, Siles-Lucas M. 2009.** What is new about animal and human dirofilariosis? Trends Parasitol. 25: 404-409. doi: 10.1016/j.pt.2009.06.003.
199. **Simon F, Siles-Lucas M, Morchon R, Gonzalez-Miguel J, Mellado I, Carreton E, Montoya-Alonso JA. 2012.** Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. Clin Microbiol Rev. 25: 507-544. doi: 10.1128/CMR.00012-12.
200. **Skotarczak B. 2003.** Canine ehrlichiosis. Ann Agric Environ Med. 10: 137-141.
201. **Skotarczak B. 2018.** The role of companion animals in the environmental circulation of tick-borne bacterial pathogens. Ann Agric Environ Med. 25: 473-480. doi: 10.26444/aaem/93381.
202. **Sonenshine DE, Roe MR. 2014.** Biology of ticks. 2Th ed. New York. Oxford University Press.
203. **Speck S, Reiner B, Wittenbrink MM. 2001.** Isolation of *Borrelia afzelii* from a dog. Vet Rec. 149: 19-20. doi: 10.1136/vr.149.1.19.
204. **Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. 2012.** Lyme borreliosis. Lancet. 379: 461-473. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60103-7.

205. **Steere AC. 2001.** Lyme disease. N Engl J Med. 345: 115-125. doi: 10.1056/NEJM200107123450207.
206. **Steere AC. 2010.** *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease, Lyme borreliosis). En: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th. Philadelphia, PA, Elsevier. p 3071-3081.
207. **Stillman BA, Monn M, Liu J, Thatcher B, Foster P, Andrews B, Little S, Eberts M, Breitschwerdt EB, Beall MJ, Chandrashekar R. 2014.** Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. J Am Vet Med Assoc. 245: 80-86. doi: 10.2460/javma.245.1.80.
208. **Straubinger RK, Summers BA, Chang YF, Appel MJ. 1997.** Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. J Clin Microbiol. 35: 111-116.
209. **Strickland KN. 1998.** Canine and feline caval syndrome. Clin Tech Small Anim Pract. 13: 88-95. doi: 10.1016/S1096-2867(98)80012-1.
210. **Stromdahl EY, Williamson PC, Kollars TM, Jr., Evans SR, Barry RK, Vince MA, Dobbs NA. 2003.** Evidence of *Borrelia lonestari* DNA in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) removed from humans. J Clin Microbiol. 41: 5557-5562. doi: 10.1128/jcm.41.12.5557-5562.2003.
211. **Summers BA, Straubinger AF, Jacobson RH, Chang YF, Appel MJ, Straubinger RK. 2005.** Histopathological studies of experimental lyme disease in the dog. J Comp Pathol. 133: 1-13. doi: 10.1016/j.jcpa.2004.11.006.
212. **Susta L, Uhl EW, Grosenbaugh DA, Krimer PM. 2012.** Synovial lesions in experimental canine Lyme borreliosis. Vet Pathol. 49: 453-461. doi: 10.1177/0300985811424754.
213. **Sykes JE. 2014.** Canine and feline infectious diseases. St. Louis, Mo. Elsevier/Saunders. 915 p. p.
214. **Tateishi V, Lí O, Hoyos L, Rivera H, Manchego A, Barrios L, More J. 2015.** Identificación hematológica y molecular de *Anaplasma platys* en caninos domésticos de Lima metropolitana con signos clínicos compatibles con anaplasmosis. Rev Inv Vet. 26: 111-118.
215. **Telford SR, 3rd, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH. 1996.** Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. Proc Natl Acad Sci U S A. 93: 6209-6214. doi: 10.1073/pnas.93.12.6209.
216. **Templeton TJ. 2004.** *Borrelia* outer membrane surface proteins and transmission through the tick. J Exp Med. 199: 603-606. doi: 10.1084/jem.20040033.

217. **Terrell S, Courtney C. 1998.** Heartworm in Alaska: prevalence in domestic dogs and wild canids. En: Seward R Ed. Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium '98., American Heartworm Society, Batavia, IL. p 83-86.
218. **Thomas C. 2012.** Heartworm Disease. En: Saunders E Ed. Infectious diseases of the dog and cat. 4th. St. Louis. p 865-877.
219. **Torres-Chable OM, Baak-Baak CM, Cigarroa-Toledo N, Blitvich BJ, Brito-Argaez LG, Alvarado-Kantun YN, Zaragoza-Vera CV, Arjona-Jimenez G, Moreno-Perez LG, Medina-Perez P, Machain-Williams CI, Garcia-Rejon JE. 2018.** Molecular detection of *Dirofilaria immitis* in dogs and mosquitoes in Tabasco, Mexico. J Vector Borne Dis. 55: 151-158. doi: 10.4103/0972-9062.242563.
220. **Townsend C. 1913.** Progress in the study of Verruga transmission by bloodsuckers. B ENTOMOL RES. 4: 125-128. doi: <https://doi.org/10.1017/S0007485300043030>.
221. **Tutachá D. 2016.** Identificación de animales seropositivos a enfermedades hematozoáricas: Ehrlichiosis, anaplasmosis, dirofilariasis y enfermedad de Lyme en caninos callejeros de la ciudad de Guayaquil. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Quito: Universidad Central del Ecuador. 63 p.
222. **Venco L, Manzocchi S, Genchi M, Kramer LH. 2017.** Heat treatment and false-positive heartworm antigen testing in ex vivo parasites and dogs naturally infected by *Dirofilaria repens* and *Angiostrongylus vasorum*. Parasit Vectors. 10: 476. doi: 10.1186/s13071-017-2444-6.
223. **Vezzani D, Carbajo AE, Fontanarrosa MF, Scodellaro CF, Basabe J, Cangiano G, Eiras DF. 2011.** Epidemiology of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: Risk factors, inter-annual trend and spatial patterns. Vet Parasitol. 176: 240-249. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.10.046.
224. **Vicente A. 2017.** Detección de *Ehrlichia canis* mediante PCR en tiempo final en muestras de sangre canina sospechosas provenientes de la zona de Lima Norte. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 70 p.
225. **Vicente J. 2016.** Estudio retrospectivo de la prevalencia de ehrlichiosis canina (*Ehrlichia canis*) en la ciudad de Arica – Chile periodo 2010 - 2014. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann 76 p.
226. **Villaverde C. 2017.** Evidencia serológica de *Ehrlichia* spp. en canes con cuadros de trombocitopenia en Iquitos. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 70 p.

227. **Vinasco J, Li O, Alvarado A, Diaz D, Hoyos L, Tabachi L, Sirigireddy K, Ferguson C, Moro M. 2007.** Molecular Evidence of a New Strain of *Ehrlichia canis* from South America. J. Clin. Microbiol 45 (8) 2716-2719; doi: 10.1128/JCM.01102-07
228. **Wagner B, Freer H, Rollins A, Erb HN. 2011.** A fluorescent bead-based multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies to *B. burgdorferi* outer surface proteins in canine serum. Vet Immunol Immunopathol. 140: 190-198. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.12.003.
229. **Wagner B, Freer H, Rollins A, Garcia-Tapia D, Erb HN, Earnhart C, Marconi R, Meeus P. 2012.** Antibodies to *Borrelia burgdorferi* OspA, OspC, OspF, and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs. Clin Vaccine Immunol. 19: 527-535. doi: 10.1128/CVI.05653-11.
230. **Walls JJ, Greig B, Neitzel DF, Dumler JS. 1997.** Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 35: 853-855.
231. **Waner T, Harrus S, Bark H, Bogin E, Avidar Y, Keysary A. 1997.** Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. Vet Parasitol. 69: 307-317. doi: 10.1016/s0304-4017(96)01130-2.
232. **Waner T, Harrus S, Jongejan F, Bark H, Keysary A, Cornelissen AW. 2001.** Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. Vet Parasitol. 95: 1-15. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00407-6.
233. **Waner T, Nachum-Biala Y, Harrus S. 2014.** Evaluation of a commercial in-clinic point-of-care polymerase chain reaction test for *Ehrlichia canis* DNA in artificially infected dogs. Vet J. 202: 618-621. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.10.004.
234. **Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac Mursic V, Rossler D, Will G. 1996.** Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. Infection. 24: 208-212. doi: 10.1007/bf01713341.
235. **Wolstenholme AJ, Evans CC, Jimenez PD, Moorhead AR. 2015.** The emergence of macrocyclic lactone resistance in the canine heartworm, *Dirofilaria immitis*. Parasitology. 142: 1249-1259. doi: 10.1017/S003118201500061X.
236. **Zapata I. 2014.** Seroprevalencia de ehrlichiosis en *Canis lupus familiaris* de la jurisdicción de Cesamica del distrito de Castilla-Piura. Tesis de Médico Veterinario. Piura: Universidad Nacional de Piura. 74 p.
237. **Zúñiga R. 2018.** Frecuencia serológica de *Ehrlichia canis* en pacientes caninos sospechosos a la enfermedad durante el periodo 2014-2016 en Lima Norte. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 100 p.

Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO AL PROPIETARIO DE ANIMALES - USO DE ANIMALES PARA INVESTIGACIÓN

HOJA DE INFORMACION

Como propietario o agente debidamente autorizado para el propietario, se le ha pedido que su animal participe en un estudio de investigación. Se requiere su consentimiento informado antes de este uso.

Lea atentamente este documento y el Formulario de consentimiento que lo acompaña y siéntase libre de hacer cualquier pregunta que pueda tener.

Título del proyecto:

Prevalencia de enfermedades transmitidas por vectores en perros domésticos de zonas rurales del departamento de Tumbes

Periodo de ejecución del proyecto: 15/01/20 a 30/12/20

Nombre del Investigador(es) Principal(es):

Luis A. Julca Silva (luis.julca1@unmsm.edu.pe; cel.: 950284444)

Luis A. Gómez-Puerta (lgomez@unmsm.edu.pe; cel.: 996268777)

Institución:

Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria

Personas responsables de los animales durante el estudio de investigación:

Luis A. Julca Silva

Luis A. Gómez-Puerta

Objetivo del estudio:

El objetivo general del presente estudio es Determinar las prevalencias de las enfermedades transmitidas por vectores en perros domésticos de zonas rurales del departamento de Tumbes, Perú.

Muestra biológica requerida:

Sangre del animal

Participación voluntaria:

La participación de su animal es voluntaria, y usted puede retirar su aprobación por cualquier motivo y en cualquier momento. Si no desea participar, no tiene que proporcionar ningún motivo para su decisión. Negarse a participar o retirarse no afectará de ninguna manera la atención a la que tienen derecho los participantes animales. Si se retira, todos los datos recopilados sobre su animal se conservarán para su análisis.

Riesgos imprevistos:

Los riesgos imprevistos pueden surgir en cualquier momento de la colecta de sangre, esto involucra principalmente la aparición de hematoma en el lugar de la venopunción. Los investigadores atenderán al animal si sucede esto.

Terminación de la participación por el investigador jefe:

Los investigadores de investigación tienen el derecho de terminar el estudio de investigación para cualquiera y todos los participantes en cualquier momento y por cualquier motivo.

Implicaciones financieras:

No habrá ningún costo para usted por la participación de su animal en el estudio de investigación. No se le cobrará por ninguno de los procedimientos realizados únicamente para los fines del estudio. No recibirá ningún reembolso por la participación de su animal en el estudio de investigación.

Transferencia de conocimiento / Publicación de hallazgos de investigación:

Los resultados obtenidos serán enviados a usted para su conocimiento.

Privacidad:

La información recopilada por los investigadores se utilizará de acuerdo con los Principios de Privacidad de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Confidencialidad

Se mantendrá la confidencialidad del propietario y del animal. No se realizará ninguna identificación de individuos al informar o publicar los datos que surjan de este estudio.

Preguntas:

1. Si tiene alguna pregunta o inquietud relacionada con los aspectos prácticos del estudio de investigación, no dude en preguntar en cualquier momento. Puede ponerse en contacto con el personal de investigación utilizando los datos de contacto proporcionados anteriormente.
2. Este estudio de investigación ha sido aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO - PARA LA PARTICIPACIÓN ANIMAL EN LA INVESTIGACIÓN

IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL

Nombre del animal:.....

Raza:.....

Edad:.....

Sexo: macho ☐ hembra ☐

1. Yo.....(escriba su nombre en letra de imprenta) certifico que tengo al menos 18 años de edad y soy el propietario del (de los) animal (es) mencionado (s) anteriormente y que el (los) animal (s) está (n) libre (s) de cualquier derecho de retención o reclamo de cualquier otra (s) persona (s).
2. Reconozco que he leído la hoja de información adjunta para el proyecto de investigación titulado: **Prevalencia de enfermedades transmitidas por vectores en perros domésticos de zonas rurales del departamento de Tumbes** y he aceptado la participación de mi (s) animal (es) para el estudio de investigación.
3. Entiendo que esta participación en la investigación implicará dejar que usen la muestra de sangre de mi (s) animal (es) por los investigadores de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Asimismo, he tenido la oportunidad de hacer preguntas y discutir cualquier aspecto de la participación con el investigador
4. Entiendo que la participación de mi (s) animal (es) es voluntaria, y puedo retirar mi (s) animal (es) por cualquier motivo y en cualquier momento. Mi consentimiento es dado libremente.
5. Entiendo que siempre existe algún riesgo cuando se realizan el manejo y los procedimientos de los animales. Entiendo que el (los) investigador (es) me informarán de cualquier nuevo riesgo que pueda identificarse o cualquier cambio importante en la forma en que se realizará el estudio.
6. Soy consciente de que este proyecto cuenta con la aprobación actual del Comité de Ética Animal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
7. Entiendo que todos los datos privados que pertenecen a mí y a mi (s) animal (es) serán tratados con estricta confidencialidad.
8. Soy consciente de que debo conservar una copia de este Formulario de consentimiento y la hoja de información adjunta.

CONSENTIMIENTO DEL PROPIETARIO / AGENTE AUTORIZADO

.....

Firma del dueño

.....

Fecha

.....

Firma y Nombre del Investigador

.....

Fecha

Anexo 2

FICHA DE DATOS - ETV

Registro N° _____.

Datos completados por el dueño de la mascota:

Nombre del dueño: _____.

Distrito de procedencia: _____.

Teléfono*: _____.

Nombre de la mascota: _____ Edad: _____

Sexo: _____

A) Lugar de crianza de su mascota

a) Solo en casa (adentro) b) Solo en Calle c) Mixto(ambos)

Datos completados por el responsable de la toma de muestra:

1. Raza:

a) Mestizo b) No mestizo

2. Evidencia de garrapatas:

a) Presencia b) Ausencia

3. Tamaño del pelaje:

a) Corto b) Largo c) sin pelo

Resultado: () Ehrlichiosis () Anaplasmosis () Dirofilariasis () Borreliosis

*Los resultados de la prueba serán enviados vía mensaje de texto a los dueños de la mascota de manera gratuita.

Anexo 3



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA)



Lima, 4 Diciembre de 2019

Constancia de Autorización Ética

Visto la importancia del proyecto y considerando que en el mismo, se han tomado en cuenta los aspectos de Ética y Bienestar Animal. El CEBA de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos expide la presente **Constancia de Autorización Ética** del proyecto titulado **"Prevalencia de enfermedades transmitidas por vectores en perros y gatos domésticos de diversas localidades del Perú"** cuyo número de registro corresponde a CEBA-2019-011

Atentamente,


MV.MSc Alberto Soto Sato
Presidente del Comité Ética y Bienestar Animal
FMV. UNMSM

